

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Physique pour les sciences du vivant**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Christophe HORVATH

Thèse dirigée par **Vincent FORGE**

préparée au sein du **Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux**
dans l'**École Doctorale de Physique, Grenoble**

Réalisation de nanofils de protéines

Thèse soutenue publiquement le **26 septembre 2011**,
devant le jury composé de :

Mme Françoise OCHSENBEIN

Chercheur au CEA Saclay, Rapporteur

M Fabien MIOMANDRE

Maître de conférences à l'ENS Cachan, Rapporteur

Mlle Charlotte VENDRELY

Maître de conférences à l'université de Cergy-Pontoise, Examineur

M Franz BRUCKERT

Professeur à l'INPG, Examineur

M Vincent BOUCHIAT

Chercheur à l'institut Néel, Examineur

M Vincent FORGE

Chercheur au CEA Grenoble, Directeur de thèse



Résumé

Ce travail de thèse propose de réaliser un nanofil électrique auto-assemblé constitué de protéines. L'unité de base de ce nanofil est une protéine chimère comprenant un domaine capable de former des fibres amyloïdes (Het-s 218-289) et un domaine capable d'effectuer des transferts d'électrons (une rubrédoxine). Le premier domaine permet la réalisation d'une fibre par auto-assemblage tandis que le deuxième est exposé à la surface de cette structure. Les caractéristiques redox du domaine exposé permettent aux électrons de se déplacer d'un bout à l'autre de la fibre par sauts successifs. Un tel nanofil a été créé et caractérisé par différentes techniques biophysiques. Ensuite, la preuve de la conduction des nanofils a été apportée sur des ensembles d'objets, de manière indirecte par électrochimie, et de manière directe par des mesures tension/courant. Ces travaux ouvrent la voie à la réalisation d'objets biocompatibles, biodégradables, possédant des propriétés électroniques exploitables dans des dispositifs technologiques.

Summary

The research described in this thesis aims at creating a self-assembled nanowire only made of proteins. The building block of this wire is a chimeric protein that comprises an amyloid fibril forming domain (Het-s 218-289) and an electron transfer domain (rubredoxin). The first one self-assembles in amyloid fibrils which display the second at their surface. Redox characteristics of the exposed domain allow electrons to move from one extremity of the fibril to the other by successive jumps. Such a nanowire has been created and characterized by various biophysical experiments. Then, the conductivity of the nanowires has been demonstrated on sets of wires by electrochemistry and by direct current measurements. These experiments pave the way for future design of biocompatible and biodegradable objects that possess usable electronic properties.

Remerciements

En tout premier lieu, j'aimerais remercier le docteur Vincent Forge qui m'a encadré durant l'ensemble de mes travaux de thèse. En plus d'être un excellent scientifique, il possède des qualités humaines qui font de chaque interaction un réel plaisir.

Je remercie les différents membres de l'équipe AFFOND pour le plaisir qu'ils m'ont offert à travailler dans la bonne humeur et avec motivation : Christel avec qui j'ai partagé le bureau et le stress des dépôts de projet, Delphine avec qui j'ai partagé le bureau et la galère thésardienne, Carole qui sait tout faire et surtout aider à la purification des protéines, Babeth qui a transformé l'organisation du labo en une Rolls bien huilée, Nicolas qui est un collègue efficace, Gregory qui a permis de rééquilibrer le temps de parole homme/femme, Alexis la force tranquille, et Anthony mon stagiaire préféré.

Je salue particulièrement les initiateurs du projet. Vincent Forge était à l'origine de cette idée ayant aboutie à une demande de brevet. Nicolas Duraffourg a suivi de près différentes expériences du projet et m'a fortement aidé pour la RPE et l'électrochimie. Mohamed "Ahmid" Atta est un biochimiste qui m'a aidé pour mes débuts en clonage, et qui connaît tout des protéines à centre fer-souffre et de leur manipulation. Enfin, Marc Fontecave est un éminent scientifique qui a participé à la réflexion autour du projet. Je rajoute, Vincent Bouchiat qui a comblé nos nombreuses lacunes sur le plan technologique et sur la caractérisation du transport d'électrons. C'est désormais un membre indispensable au projet.

Il est difficile de dresser une liste exhaustive de toutes les personnes m'ayant aidé dans ce projet. Il y a parfois des petites discussions qui permettent d'en apprendre beaucoup. En plus des personnes listées ci-dessous, je remercie chaleureusement tous ceux avec qui j'ai eu l'occasion de parler de sciences :

Biophysique en tout genre : Forge sensei.

Purification des protéines : Carole Mathevon.

RPE & Squid : Nicolas Duraffourg, Serge Gambarelli, Stéphane Ménage, Jean-François Jacquot.

Electrochimie : les trois Vincent (Fourmond, Artero et Nivière).

Microscopie électronique : Dafna Fenel, Guy Schoehn.

Procédés technologiques : Vincent Bouchiat, David Peyrade, Nicolas Pauc, Bassem Salem, Thibault Honegger, Kevin Berton.

Remerciements

Biologie moléculaire : Patrice Catty.

Bioinformatique : Serge Crouzy.

Dynamic Light Scattering : Alexandre Chenal.

J'aimerais également remercier toutes les personnes qui ont fait de la vie au laboratoire une période aussi agréable qu'enrichissante : Florence, Julien, Laetitia, Peggy, Séverine, Sylvain, Sylvia et les nombreux stagiaires des uns et des autres...

Je remercie aussi mes amis thésards avec qui nous avons échangé longuement sur les joies et les peines de la vie de thésard.

Je remercie les membres de ma famille grâce auxquels je me suis construit. Cette thèse n'aurait pas eu le même aboutissement sans eux.

Et je remercie ma fiancée Tiphaine pour son soutien sans faille. La vie et le travail n'auraient pas la même saveur sans elle.

Sommaire

Résumé	1
Remerciements	2
Sommaire	4
Introduction générale	9
1 Le contexte	9
1.1 Le contexte socio-économique.....	9
1.2 Les matériaux biodégradables.....	9
1.3 Les matériaux résorbables.....	10
2 Les protéines et leurs applications	11
2.1 Description générale	11
2.2 Les différentes fonctions exploitables.....	13
2.2.1 Les interactions biochimiques.....	13
2.2.2 Les moteurs moléculaires.....	16
2.2.3 Les protéines en tant que structure.....	17
2.2.4 Les protéines non-naturelles	22
3 Ce que l'on désire faire	24
3.1 Le constat	24
3.2 Le projet	24
3.3 Les choix	24
4 Les fibres amyloïdes	26
4.1 Leur histoire	26
4.2 Des éléments de structure	27
4.2.1 La morphologie par microscopie électronique.....	27
4.2.2 La spectroscopie infrarouge	28
4.2.3 La diffraction aux rayons X	29
4.2.4 Les structures résolues	29
4.3 La stabilité et les propriétés mécaniques.....	30
4.4 Les applications.....	32
4.4.1 Un support pour l'immobilisation d'enzymes	32
4.4.2 La croissance cellulaire	32
4.4.3 Un support pour une étude de repliement	33
4.4.4 Une liaison streptavidine/biotine	34
4.4.5 Les nanofils conducteurs.....	34
4.5 La protéine het-s.....	35
4.5.1 La fonction naturelle	35
4.5.2 L'étude du domaine het-s 218-289	36

4.5.3	La structure de het-s 218-289	37
5	Le transfert d'électrons	39
5.1	Les phénomènes électriques en biologie	39
5.1.1	La conduction intrinsèque des protéines	39
5.1.2	Les neurones	40
5.1.3	Les nanofils bactériens exogènes	40
5.1.4	Les transferts redox	41
5.2	Les échanges redox dans les protéines	42
5.2.1	La physico-chimie des réactions redox	42
5.2.2	Les transferts redox dans les protéines	44
5.2.3	Le rôle des résidus aromatiques	47
5.2.4	Les protéines redox pour des applications	47
5.3	La classification des protéines redox	48
5.3.1	Les flavoprotéines	48
5.3.2	Les cytochromes : protéines hémiques	49
5.3.3	Les protéines non-hémiques	49
Partie 1 : Fabrication du nanofil.....		55
1	Matériels et méthodes	55
1.1	La production de protéines recombinantes	55
1.1.1	Le principe	55
1.1.2	Le domaine prion Het-s 218-289	56
1.1.3	La rubrédoxine de <i>methanococcus voltae</i>	58
1.1.4	La protéine chimère : Rd-het	61
1.2	La caractérisation des fibres amyloïdes	63
1.2.1	La formation des fibres	63
1.2.2	La fluorescence de la thioflavine	64
1.2.3	La diffusion de lumière	65
1.2.4	La microscopie électronique en transmission	66
1.2.5	La microscopie à force atomique	67
1.3	La caractérisation de la rubrédoxine	68
1.3.1	La spectroscopie d'absorbance UV-visible	69
1.3.2	La résonance paramagnétique électronique	69
1.3.3	La titration redox	71
2	La caractérisation des protéines d'origine	72
2.1	Le domaine Het-s 218-289	73
2.1.1	La production de la protéine	73
2.1.2	L'étude des fibres amyloïdes	74
2.1.3	L'étude des gels à pH 2,7	77
2.1	La rubrédoxine de <i>methanococcus voltae</i>	78

2.1.1	La production de la protéine	78
2.1.2	La stabilité de la rubrédoxine	79
2.1.3	L'étude du centre fer	80
3	La caractérisation de la protéine chimère Rd-het.....	83
3.1	La production de la protéine	83
3.1.1	Le clonage et la culture	83
3.1.2	La purification	83
3.2	La formation des fibres amyloïdes	84
3.2.1	La diffusion de lumière	85
3.2.2	La morphologie par microscopie électronique.....	86
3.2.3	La visualisation sur substrat : caractérisation par AFM.....	87
3.3	La caractérisation de la rubrédoxine	88
4	Le bilan	91
Partie 2 : Caractérisation électronique du nanofil.....		93
1	Matériels et méthodes	93
1.1	La caractérisation par voltamétrie cyclique	93
1.1.1	La théorie de la voltamétrie cyclique	93
1.1.2	Le montage expérimental	96
1.1.3	Le traitement des données	97
1.2	Les mesures entre électrodes.....	98
1.2.1	Le principe	98
1.2.2	Les mesures à basse température	98
1.3	Les mesures sur nanofils isolés	99
1.3.1	Le dépôt sur des réseaux d'électrodes.....	99
1.3.2	L'AFM conducteur	100
2	Les résultats.....	101
2.1	La caractérisation par voltamétrie cyclique	101
2.1.1	La rubrédoxine	101
2.1.2	La protéine chimère	103
2.2	Les mesures entre électrodes.....	106
2.2.1	Les mesures à température ambiante	106
2.2.2	L'évolution des échantillons dans le temps	107
2.2.3	L'influence de la température	108
2.3	Les mesures sur nanofil isolé	110
2.3.1	Le dépôt aléatoire sur un réseau d'électrodes	110
2.3.2	Les mesures en AFM conducteur.....	112
Conclusion et perspectives.....		115
Références bibliographiques		121

Annexes	129
1 Définition des différents acides aminés	129
2 Production de protéines recombinantes.....	137
2.1 Cartographie des plasmides.....	137
2.1.1 pet 24a	137
2.1.2 pt7-7	139
2.2 Protocole pour transformer des bactéries	139
2.3 Protocoles de purification.....	140
2.3.1 Het-s 218-289 :	140
2.3.2 Rubrédoxine de methanococcus voltae	140
2.3.3 Rd-het : lyse en acide acétique	141
2.3.4 Rd-het : lyse en urée 8 M	141

Introduction générale

1 Le contexte

1.1 Le contexte socio-économique

Le monde de la recherche, fortement impacté par le contexte socio-économique, a vu le nombre de publications scientifiques combinant les mots “environnement” et “économie” passer de moins de 10 en 1990, à plus de 6000 en 2009. 50% des publications en question ont été écrites durant les 5 dernières années¹. Cela reflète simplement que l’impact environnemental est un des enjeux économiques grandissants de notre société. Ainsi, la plupart des secteurs industriels sont obligés de surveiller les conséquences sur l’environnement du cycle de leurs produits (des matières premières jusqu’à la destruction) afin de s’inscrire dans le cadre d’un développement dit “durable”. De même que leur mode de production, la destination finale des produits est désormais une donnée valorisable pour les entreprises qui n’hésitent pas à vanter la recyclabilité de leurs produits ou le respect environnemental de leur dégradation [1].

1.2 Les matériaux biodégradables

Dans ce contexte, les matériaux biodégradables gagnent en part de marché [2, 3]. D’après la législation en vigueur, un matériau dégradé est « une substance qui peut, sous l'action d'organismes vivants, se décomposer en éléments divers dépourvus d'effets dommageables sur le milieu naturel » [4]. Ces matériaux se classent en deux catégories : ceux issus de matières biologiques ou des polymères synthétiques [5-9]. Le principe scientifique sur lequel s’appuie la biodégradation est la déstructuration des chaînes carbonées composant les polymères en éléments plus petits assimilables par des organismes tels que les bactéries. Cette déstructuration doit pouvoir être initiée par des éléments présents dans la nature comme les UVs (photodégradation), l’humidité (matériaux hydrosolubles), la chaleur, l’oxygène, ou une combinaison de plusieurs de ces facteurs. Par exemple, les matériaux oxobiodégradables se dégradent avec la présence combinée d’oxygène, d’UV et de chaleur.

Cependant, biodégradable ne signifie pas écologique. En effet, les matières premières de ces matériaux peuvent provenir d’éléments biologiques issus de l’agriculture intensive, ou même de

¹ Statistiques extraites de la base de données “web of science” avec les mots *environment*, *economy* et leurs dérivés

produits dérivés du pétrole. Les procédés de fabrication ou de dégradation de ces matériaux peuvent conduire à des métabolites toxiques ou des rejets de gaz à effet de serre comme le méthane [10, 11].

L'industrie des matériaux biodégradables est donc en plein essor, et a encore des défis à surmonter. De plus, les domaines d'application sont encore peu nombreux (emballages et sacs jetables). C'est donc un domaine qui demande de l'investissement en termes de recherche afin de trouver de nouveaux matériaux, les procédés de fabrication associés, ainsi que de nouvelles applications.

1.3 Les matériaux résorbables

La définition des biomatériaux la plus largement retenue est celle donnée par Williams en 1987 : « Biomaterials are those materials which are used in medical, dental, veterinary or pharmaceutical applications and which come into intimate and sustained contact with tissues of the body, generally (although not exclusively) being implanted within these tissues » [12]. Le préfixe “bio” fait ici référence à la notion de biocompatibilité (définie plus tard comme la capacité d'un matériau à accomplir un rôle spécifique avec une réponse appropriée de l'hôte) et non de biodégradabilité. Mais ces deux termes peuvent se retrouver dans le cadre des matériaux résorbables comme il en existe déjà pour le matériel chirurgical [9, 13-15].



Figure 1 : Matériaux résorbables. a) Implants de renforcement pariétal. b) Stent DREAM. c) Pansement de collagène résorbable.

Le matériau résorbable le plus connu est le fil de suture qui est composé d'acide polyglycolique (PGA), mais il existe également la gélatine hémostatique (pansement fait de collagène) ou les membranes de collagène pour la reconstruction osseuse dentaire (Figure 1). D'autres types de matériaux comme les coraux ont été utilisés comme support à la reconstruction osseuse. Il existe également des implants mammaires à durée limitée faits d'acide hyaluronique. L'apparition des stents résorbables (maillage semi-rigide servant à maintenir un vaisseau ouvert), et des implants de renforcement pariétal semi-résorbables (paroi synthétique pour soigner les hernies) laisse à

penser qu'il y a encore de nombreux objets à développer dans le domaine pour améliorer la récupération et le suivi post opératoire [16].

2 Les protéines et leurs applications

Le travail de recherche présenté dans cette thèse s'inscrit dans une thématique de recherche grandissante qui consiste à utiliser des protéines dans des dispositifs technologiques. En plus d'être biodégradables, celles-ci peuvent être biocompatibles². A l'heure où la miniaturisation atteint l'échelle du nanomètre, ces molécules présentent des niveaux de complexité et de fonctionnalité inégalés, qui ont été sélectionnés par des milliers d'années d'évolution [18-20]. De nombreux travaux existants consistent donc à combiner ces propriétés uniques avec des dispositifs technologiques plus classiques qui sont généralement basés sur les procédés de la microélectronique [21, 22]. Ce domaine sort donc du simple cadre des matériaux dégradables et des biomatériaux. Cependant, ce type de recherche en est à ses débuts et est en plein essor. Il est donc fort probable que des découvertes futures permettront de s'émanciper de la partie "technologie standard", et ainsi de revenir vers des applications biodégradables et/ou biomatériaux. Ce travail de thèse permettra peut-être d'apporter un élément à cette évolution.

Une présentation générale des protéines et de leurs caractéristiques va être faite afin de comprendre l'étendue de ce que peuvent réaliser ces objets moléculaires. Nous nous focaliserons ensuite sur certaines protéines d'intérêt qui sont le cœur de ce projet de thèse.

2.1 Description générale

Les protéines sont des polymères d'acides aminés, ou plus précisément d'acides α -aminés. Ceux-ci sont organisés autour d'un atome central de carbone (nommé C α) portant : une fonction amine, un groupement acide carboxylique et une chaîne latérale variable selon l'acide aminé et faisant la particularité de celui-ci (voir annexe 1). Le groupement carboxyle d'un acide aminé peut former une liaison covalente avec la fonction amine d'un autre acide aminé. Les réactions peuvent ainsi s'enchaîner jusqu'à former un polymère d'acides aminés nommé peptide ou polypeptide.

² Il existe malgré tout certaines protéines toxiques qui sont à proscrire d'éventuelles applications : [17] C. Lesieur, B. VecseySemjen, L. Abrami, M. Fivaz, F.G. vanderGoot, Mol. Membr. Biol., 14 (1997) 45.

Ces peptides sont définis par la séquence d'acides aminés. Aussi appelée structure primaire, cette chaîne va interagir sur elle-même localement pour former des structures secondaires (feuillets β , hélices α , turn [23]). Ces interactions locales sont des liaisons hydrogènes³ entre différentes fonctions acides et amines. Ensuite, les chaînes latérales des différentes structures secondaires vont interagir les unes avec les autres (interactions électrostatiques ou Van der Waals) pour former la structure tertiaire de la protéine. Certaines protéines ont encore besoin d'interagir ensemble à un niveau supplémentaire pour être fonctionnelles. On parle alors de structure quaternaire (Figure 2).

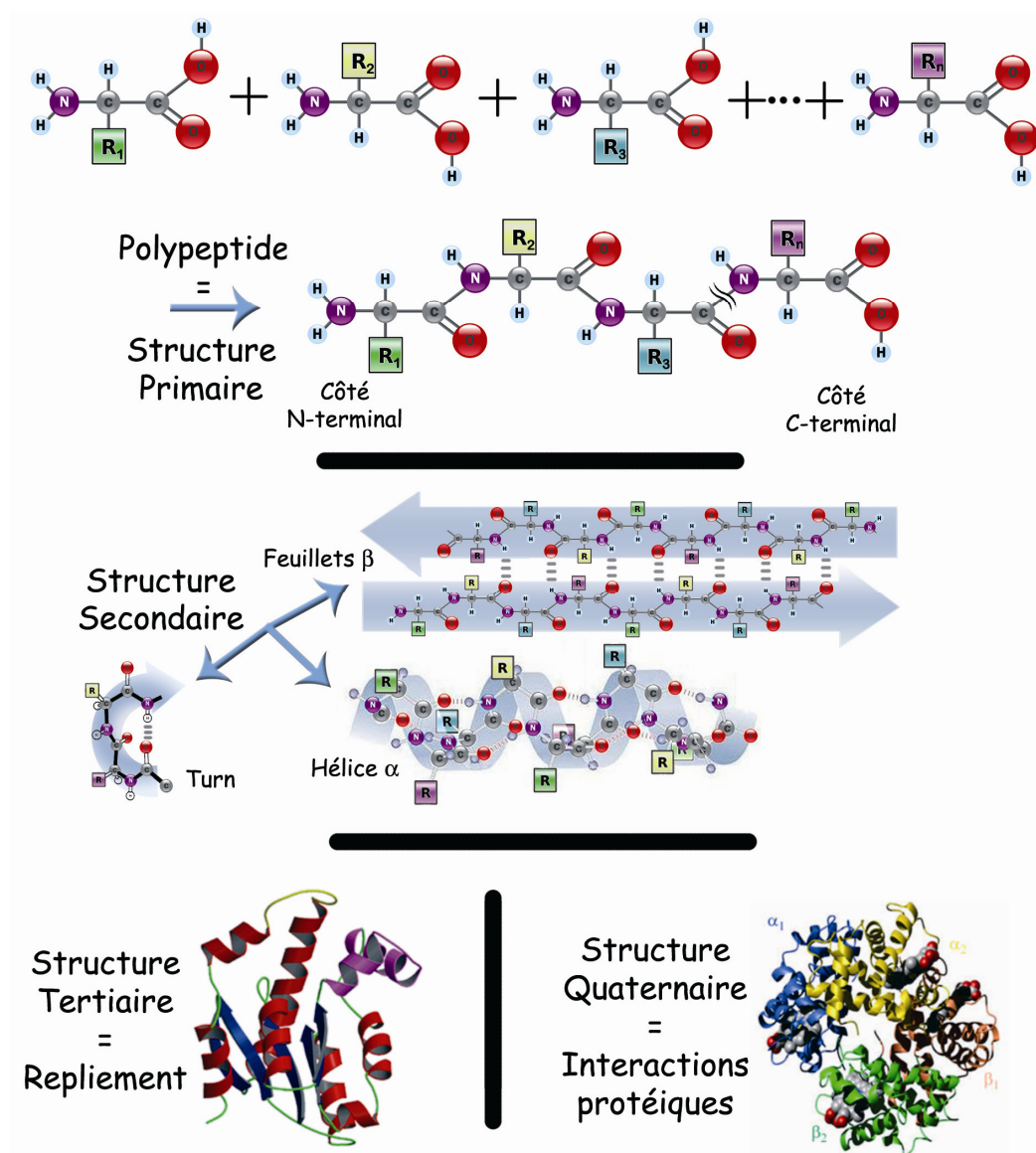


Figure 2 : Structure des protéines

³ Elles sont parfois notées liaisons H. Dans le cas des feuillets β , elles peuvent aussi s'appeler interactions β .

Les mécanismes d'interactions qui gouvernent la structure des protéines sont complexes et leur étude est un domaine de recherche appelé "repliement des protéines". Il s'agit d'un phénomène auto-assemblé aboutissant à une structure à trois dimensions. C'est cet arrangement tridimensionnel qui va généralement gouverner les interactions possibles avec les autres entités chimiques (protéines, molécules, atomes) et être à l'origine des mécanismes présents dans le monde vivant [24]. L'étude des protéines se fait généralement dans un but de compréhension de ces interactions. Cela permet notamment de comprendre les éventuels dérèglements à l'origine de pathologies et ainsi d'identifier d'éventuels traitements.

2.2 Les différentes fonctions exploitables

Mais les protéines intéressent désormais d'autres domaines de la communauté scientifique. Certaines caractéristiques de l'immense panel de fonctions que les protéines accomplissent dans les cellules vivantes peuvent être détournées et utilisées à des fins technologiques. D'un point de vue biologique, les fonctions des protéines sont classées en plusieurs catégories : les *protéines de transport*, les *protéines régulatrices*, les *protéines de signalisation*, les *protéines de structure* et les *protéines motrices*. Du point de vue des applications technologiques, elles peuvent être séparées selon trois types de fonctions exploitables : les interactions biochimiques, les moteurs moléculaires et les structures protéiques. Chaque type va être présenté avec des exemples d'application. Les peptides de synthèse, qui n'exploitent pas directement les fonctions des protéines, seront traités dans un quatrième temps.

2.2.1 Les interactions biochimiques

Toutes les protéines remplissent leur rôle grâce aux interactions qu'elles ont avec les différents éléments de leur environnement (protéines, molécules, membranes). Mais dans certains cas, ce n'est qu'un aspect secondaire qui sert un but plus intéressant en termes d'application. Les exemples présentés ici sont ceux qui exploitent directement cette interaction.

La biocatalyse redox

Les interactions biochimiques peuvent être mises à profit dans l'industrie chimique. Il existe parmi les protéines des catalyseurs de réaction qui peuvent être utilisés pour améliorer le rendement des réactions soit directement, soit dans des approches bio-inspirées.

On peut notamment citer les Monooxygénase de Baeyer–Villiger qui ont montré leur capacité à faire des oxydations énantiosélectives, des sulfoxydations énantiosélectives et des epoxydations [25, 26].

De nombreux travaux ont utilisé les hydrogénases pour catalyser la conversion des protons en dihydrogène. Cette molécule est considérée comme ayant un gros potentiel pour succéder aux énergies fossiles. N'existant pas naturellement, sa production à coût modéré est l'élément clé d'une réelle exploitation. Alors que la chimie standard ne sait catalyser sa conversion qu'en employant des métaux onéreux comme le platine, les hydrogénases y parviennent à l'aide d'un cofacteur binucléaire Fe-Fe ou Ni-Fe [27, 28]. Ce phénomène a inspiré de nombreux travaux mais une utilisation industrielle n'est pas encore envisageable (Figure 3) [29].

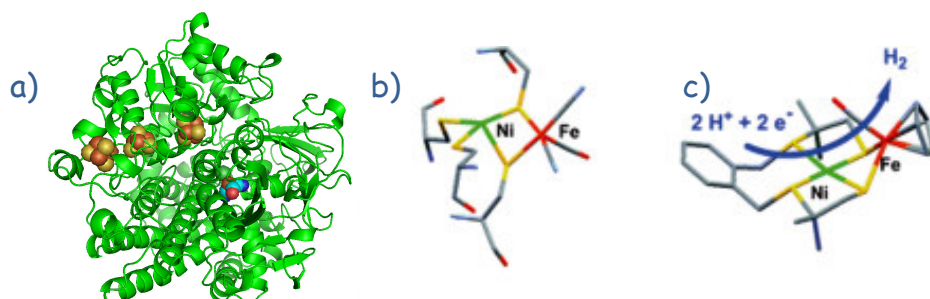


Figure 3 : a) Hydrogénase Ni-Fe catalysant la synthèse du dihydrogène (pdb 2FRV) [27]. b) Site actif Ni-Fe c) Complexe synthétique Ni-Fe bioinspiré [29].

Les biocapteurs et biopuces

Les interactions biochimiques sont l'élément clé de tous biocapteurs. Si l'un des deux acteurs d'une réaction (la sonde) est immobilisé sur une surface, la présence de l'autre acteur (la cible) peut être sondée dans un milieu. Ces dispositifs ont des implications en recherche, en diagnostique, en surveillance sanitaire, en agroalimentaire, en études environnementales et en contre-terrorisme [30].

Les biocapteurs nécessitent que la réaction sonde/cible soit détectable. L'existence d'un transducteur adapté à la réaction biochimique d'intérêt est indispensable. Celui-ci a pour rôle de transformer le signal résultant de l'interaction en un signal qui peut être traité et quantifié électroniquement.

Le transducteur le plus ancien et le plus évident est une électrode qui va collecter les électrons produits par la réaction entre cible et sonde. Cela implique que la réaction produise des électrons

(ce qui n'est pas toujours le cas) et présente l'avantage d'avoir une transduction immédiate de la réaction en signal électronique. Un des plus anciens biocapteurs consiste en la détection du glucose par la glucose oxydase (Figure 4). L'oxydation du glucose en gluconolactone par cette protéine produit également deux ions H^+ et deux électrons. La destination naturelle pour ces éléments est la réduction d'oxygène en peroxyde d'hydrogène ; mais les électrons peuvent être captés par l'électrode [31]. Le nombre d'électrons captés par unité de temps (c'est-à-dire le courant), permet de remonter à la concentration en glucose.

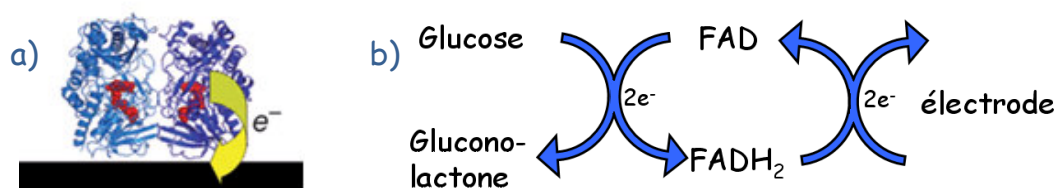


Figure 4 : Principe de fonctionnement d'un biocapteur à glucose [31]. a) Schéma d'une glucose oxydase transmettant ses électrons à un substrat. b) Réaction de dégradation du glucose produisant deux électrons.

D'autres transducteurs sont basés sur des phénomènes optiques comme la fluorescence ou la résonance plasmonique de surface (SPR). Cette dernière technique permet de détecter n'importe quelle interaction biochimique sur une surface plasmonique [32, 33]. L'association de la cible sur la sonde modifie localement l'indice de réfraction de la surface. Les propriétés de réflexion de cette surface sont alors changées ; ce qui peut être évalué par un système optique associant un laser et un détecteur (Figure 5). Ce système requiert la présence d'une surface particulière dite "plasmonique" qui est généralement une fine couche d'or. Cette technique est donc onéreuse, ce qui limite son exploitation.

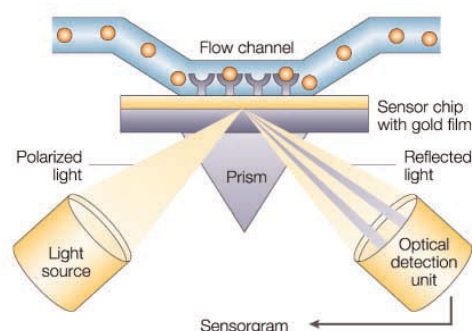


Figure 5 : Principe de la SPR. La lumière est réfléchié différemment s'il y a reconnaissance [33].

De nombreux mécanismes mettent en jeu la fluorescence. Le mécanisme le plus simple consiste en l'établissement d'un lien entre la cible et un fluorophore (molécule capable d'émettre de la fluorescence). Ainsi, les cibles peuvent être détectées visuellement si elles sont immobilisées à la surface suite à l'interaction avec la sonde. L'existence de quenchers (inhibiteurs de fluorescence) permet d'autres utilisations de la fluorescence lorsque la fixation du fluorophore directement sur la cible n'est pas possible [34, 35].

Les piézoélectriques ont également été utilisés en tant que transducteur. En effet, la présence d'éléments à leur surface peut faire varier leur fréquence de résonance, qui est un paramètre aisément mesurable [36, 37].

Un autre exemple est celui du canal ionique dans une couche lipidique déposée sur une électrode. Si la sonde est attachée à un de ces canaux, son interaction avec la cible va fermer le canal. Les ions ne vont donc plus s'écouler de l'autre côté de la couche lipidique et cette différence de conductivité peut-être détectée par l'électrode [38].

2.2.2 Les moteurs moléculaires

De manière générale, les moteurs moléculaires sont des assemblages (plus ou moins complexes) de molécules qui convertissent une énergie chimique, optique ou électrique en mouvement physique. Il y a deux classes chez les moteurs constitués de protéines : les moteurs rotatifs et les moteurs linéaires. Parmi les premiers se trouvent notamment : le complexe F_0F_1 -ATP synthase dont la rotation est activée par le gradient de proton et permet la transformation d'ADP en ATP (action réversible), le moteur du flagelle bactérien utile à la motilité cellulaire [39, 40] (Figure 6 c) les hélicases qui séparent les bases de l'ADN en se déplaçant le long des brins [41, 42]. Dans la seconde classe, il y a les polymérase qui se déplacent le long de l'ADN pour polymériser un brin complémentaire (ADN) ou transcrit (ARN) [43] (Figure 6 b); ainsi que plusieurs protéines motrices comme les myosines et kynésines qui se déplacent respectivement le long des filaments d'actine et microtubules [44, 45] (Figure 6 a).

En maîtrisant la position des myosines sur un substrat, Mansson et al contrôlent le mouvement de filaments d'actine qui peuvent être utilisés comme cargos moléculaires [46, 47]. Ces derniers pourraient avoir des applications sur des dispositifs technologiques pour effectuer du triage, délivrer des substances ou assembler des composants.

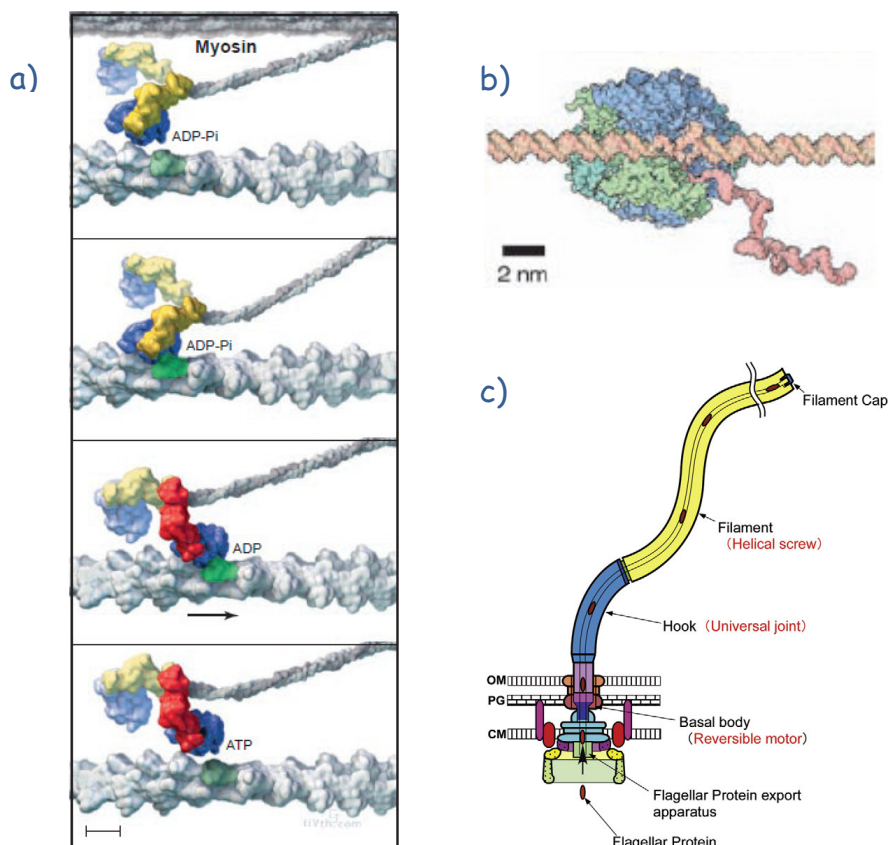


Figure 6 : Exemples de moteurs moléculaires. a) Déplacement d'une myosine sur un filament d'actine [45]
b) RNA polymérase c) Moteur du flagelle [40].

Les moteurs moléculaires ont un rendement énergétique allant de 50 à 100%, ce qui est excellent⁴. Ils sont donc des cibles privilégiées en tant que mécanismes biologiques à transférer aux systèmes technologiques et inspirent beaucoup d'études [43, 44, 48-50]. Cependant, ces complexes protéiques ne sont pas autonomes et nécessitent un environnement spécifique pour fonctionner. Ils requièrent généralement la présence d'ATP, ce qui complique fortement leur intégration dans un dispositif déconnecté du vivant. Ils sont également plus fragiles que les objets cristallins.

2.2.3 Les protéines en tant que structure

Le modelage et la confection de formes spécifiques sont très complexes avec les moyens technologiques standards, alors que la nature fait et défait constamment toutes sortes de formes (sphères, fils, réseaux) grâce aux propriétés d'auto-assemblage des protéines. C'est le cas

⁴ A titre de comparaison, une voiture à essence possède un rendement énergétique inférieur à 20%

notamment des protéines du cytosquelette (actine, microtubule) [51, 52]. De nombreuses études ont également montré que les protéines sont capables de former des structures non-naturelles. L'assemblage et le désassemblage de ces structures sont généralement gouvernés par des conditions physico-chimiques particulières de pH, force ionique, concentration, ou température. L'utilisation des protéines est donc la plus évidente en nanotechnologies où elles servent de blocs de construction auto-assemblés. Cet assemblage protéique peut servir en tant qu'ossature qui pourra ensuite être le support d'une autre entité. Il peut aussi simplement être un "moule" qui sera ensuite recouvert d'un autre matériau auquel on veut donner cette forme [53].

Cette partie va présenter les différentes structures sphériques, 1D, 2D, ou 3D.

Objets sphériques

De nombreuses protéines peuvent s'agréger sous la forme de sphères mais les conditions de stabilité restreignent les applications possibles [54, 55]. Leurs qualités biologiques pourraient les mener vers le rôle d'agent texturant dans l'agro-alimentaire ou les cosmétiques. Cependant, ces objets n'ont généralement pas d'organisation précise et/ou connue pour le moment, donc ils ne peuvent pas être utilisés comme motif nanostructuré.

Les capsides de virus ont été parmi les premiers objets protéiques à être utilisés comme "nanostructure" [56, 57]. Composées de quelques protéines différentes (le plus souvent deux ou trois) qui s'assemblent en un motif répété, elles forment des objets sphérulites de 10 à 50 nm de diamètre.

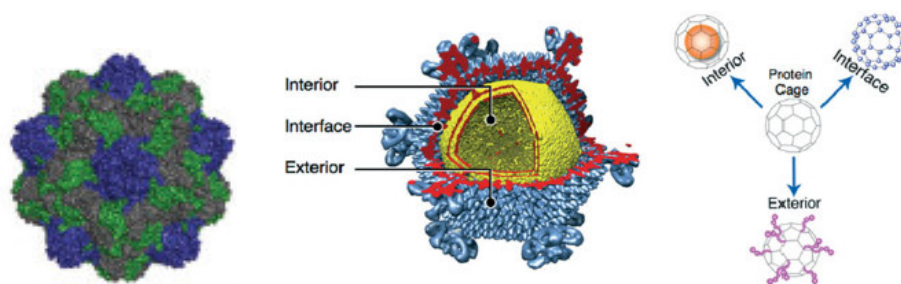


Figure 7 : Capsides de virus et voies d'utilisation [56, 57].

Plusieurs travaux ont visé à utiliser ces structures comme conteneur pour faire de l'encapsulation de molécules (par exemple pour du relargage de molécules thérapeutiques). D'autres études visent à utiliser non pas l'intérieur mais la surface de la capside à la manière d'un colloïde (Figure 7). Par exemple, la présence d'anticorps à sa surface peut permettre d'aller fixer la capside sur une tumeur et servir à faire de l'imagerie ou du relargage ciblé. Les virus peuvent

également être recouverts de métal et ainsi créer des colloïdes creux. Selon le métal employé, la particule pourra avoir des propriétés conductrices, thermiques, ou magnétiques différentes.

La ferritine qui s'organise sous la forme d'une coque servant au stockage du fer, peut être utilisée pour réaliser des nanoparticules en oxyde de fer ou de cobalt. Les particules ainsi créées sont magnétiques et ont un diamètre de 6 nm de diamètre (Figure 8) [58]. Une approche similaire avec une protéine modifiée a permis la création de colloïdes magnétiques Cobalt/Platine de 6,5 nm de diamètre [59].

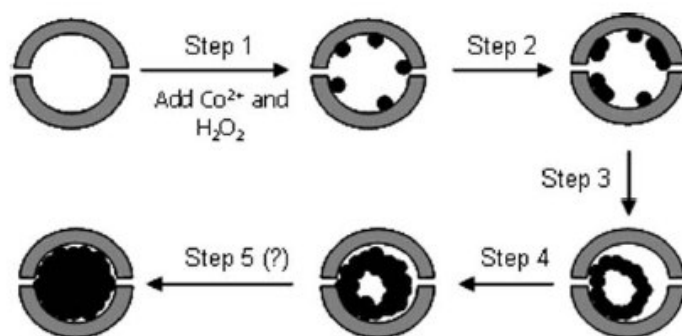


Figure 8 : Formation d'une nanoparticule d'oxyde de Cobalt à partir d'une ferritine [59].

Les nanofils

L'objet 1D, c'est à dire le fil ou le tube, est généralement la base de tout réseau car il permet de relier des nœuds. C'est donc un élément important qui inspire de nombreux travaux de recherche technologique. Les nanotubes de carbone et autres nanofils semi-conducteurs en sont un exemple [60-64].

Les structures unidimensionnelles utilisées par la nature sont généralement dynamiques et nécessitent un environnement particulier pour s'organiser (conditions salines, présence d'ATP) [51]. La métallisation de ces structures est un moyen de les stabiliser et de les rendre conductrices pour en faire des nanofils conducteurs.

Il existe plusieurs méthodes pour métalliser des structures. Dans le principe, il s'agit de réduire sous forme solide des ions en phase liquide. Cela peut être spontané [65, 66], ou nécessiter la présence d'un métal nucléateur (or ou platine) en plusieurs endroits de la structure à recouvrir [59, 67-70]. L'emploi de l'une ou l'autre méthode a des conséquences notables. Lorsqu'un nucléateur est utilisé, celui-ci est exposé à la surface de l'objet. La réduction de métal entraîne un accroissement des différentes zones de nucléation jusqu'à ce qu'elles entrent en contact. Cela

recouvre grossièrement les structures, alors que le phénomène spontané va plutôt se produire dans les cavités comme les tubes et aboutir à des fils plus fins (Figure 9).

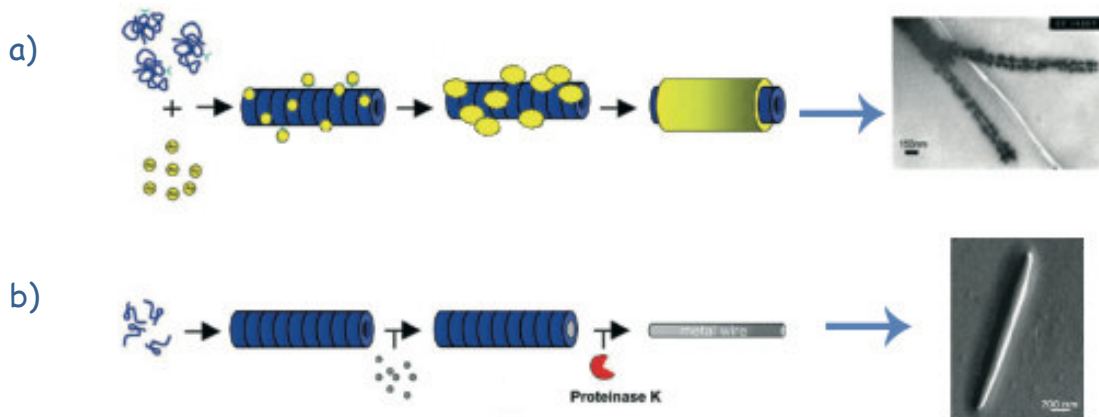


Figure 9 : Schémas de principe de la formation de nanofils par réduction de métal sur structures protéiques. a) Fixation de colloïdes à la surface de la structure protéique et croissance de métal jusqu'à formation d'une gaine [69]. b) Précipitation de métal directement à l'intérieur de la structure [65].

Ce type d'approche a été employé pour faire des nanofils à base de microtubules, d'actine, ou de fibres amyloïdes. Une approche combinée des deux techniques a permis de réaliser un câble coaxiale, dans lequel la couche de protéine joue le rôle d'isolant entre les deux zones métalliques [71]. Cependant, aucune mesure de conductivité n'est donnée. Effectuer une mesure indépendante sur les deux zones métalliques peut s'avérer délicat, techniquement parlant. Il est aussi probable que la protéine ne joue pas bien son rôle d'isolant et qu'il y ait un contact entre la gaine et le cœur du câble.

A ce jour, aucune de ces réalisations n'a dépassé le stade de la preuve de concept. Malgré la forte activité de quelques groupes dans ce domaine comme celui de Gazit, l'utilisation concrète de ce type d'objet dans l'industrie n'est pas encore prête [72].

Mis à part le rôle que peut jouer l'actine en combinaison avec les myosines (vu précédemment), les développements sur des objets unidimensionnels impliquent généralement des fibres amyloïdes ou des peptides de synthèse. Ces objets sont nettement plus stables et seront décrits en détails dans des parties qui leur sont consacrées.

Les arrangements 2D

La fixation artificielle d'une ou plusieurs entités protéiques sur une surface est un procédé courant largement utilisé dans les biopuces précédemment citées. De nombreuses méthodes ont

été développées avec chacune leurs avantages et inconvénients : adsorption [73, 74], intégration dans les monocouches auto-assemblées (SAM) [75, 76], greffage covalent, moulage [77, 78]. Cependant, aucune de ces techniques ne conduit à une réelle organisation des protéines à faible échelle et ne peut donc aboutir à de la nanostructuration.

Les couches de surface cristallines (S-layer) sont à priori les seules structures protéiques bidimensionnelles naturelles. Il s'agit de couches composées d'une seule entité protéique de 40 à 200 kDa recouvrant avec une seule épaisseur la surface de certaines *archaea*. Ces couches ont une organisation périodique et sont poreuses ; ce qui permet à des particules de s'insérer à l'intérieur. Elles ont ainsi été utilisées pour structurer des réseaux de particules (colloïdes, dots) à échelle nanométrique (Figure 10) [53, 79-81].

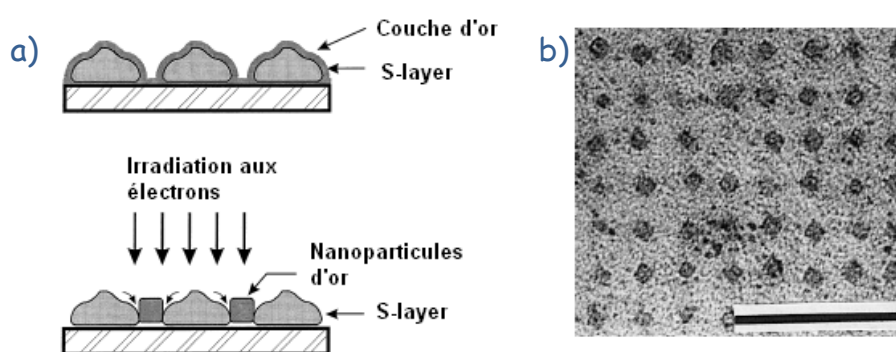


Figure 10 : Utilisation d'une S-layer pour faire de la nanostructuration [80]. a) Schéma de principe. b) Image TEM d'un réseau de particules d'or fait à partir d'une S-layer (barre d'échelle = 50nm).

Des films ont été créés artificiellement avec des fibres amyloïdes. Une orientation préférentielle des fibres se dégage et peut influencer l'alignement d'autres molécules qui ne s'aligneraient pas spontanément. Dans une étude, ce réseau a permis d'aligner des fluorophores (la thioflavine) ; ce qui entraîne l'émission d'une lumière polarisée [82].

Les réseaux 3D

Certaines protéines s'auto-organisent en réseau à trois dimensions. C'est le cas notamment des cristaux de protéines qui sont généralement utilisés pour résoudre la structure à haute-résolution des protéines [28, 83-85]. Dans le domaine médical, ils permettent une stabilisation des protéines à haute concentration (intéressant pour le stockage) [86]. Cela peut aussi être un nouveau vecteur thérapeutique potentiel qui permet par exemple une amélioration de la réponse immunitaire pour un vaccin, ou une meilleure activité des protéines dans l'estomac [87, 88].

En terme de structure, ils sont intrinsèquement concurrents des zéolites (cristaux microporeux) qui sont utilisés pour faire de la filtration à l'échelle moléculaire [89]. Plus récemment, des cristaux de lysozyme ont été utilisés par Cohen-haddar et al en tant que précurseurs à la formation d'hydrogels [90].

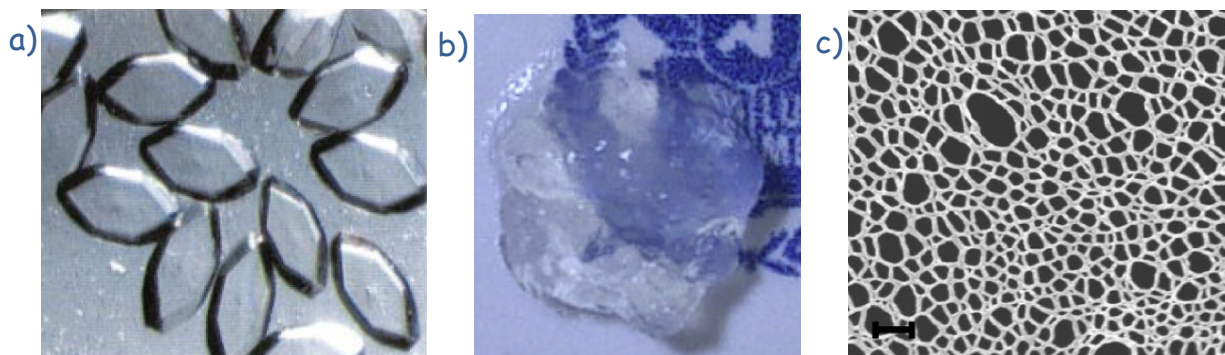


Figure 11 : a) Cristaux de protéine pouvant servir de filtre moléculaire ou de précurseur nanostructuré [87]. b) Hydrogel formé par l' α -synucléine [91]. c) Image MEB du réseau de fibres du gel montré en b) (barre d'échelle = 200 nm).

Les réseaux à trois dimensions résultent parfois d'un niveau d'interaction supérieur entre éléments unidimensionnels (fils, fibres) (Figure 11c). Ces réseaux sont généralement des hydrogels qui sont très poreux et permettent à de gros objets de s'y insérer. Ils sont principalement utilisés en ingénierie tissulaire [92-94]. Parmi les plus couramment cités, il y a les gels de collagène, de fibrine et de fibres de soie qui ont été utilisés pour l'ingénierie tissulaire des os ou du cartilage. Certaines fibres amyloïdes peuvent également former des hydrogels [91, 95-97]. La taille des pores, plus petite que dans les autres gels, les rend plus adaptés pour piéger efficacement des molécules. Bhak et al ont utilisé cette caractéristique pour stabiliser la HRP et ainsi améliorer son activité [91].

2.2.4 Les protéines non-naturelles

La modification des protéines est un aspect courant dans les différents exemples cités précédemment. Il peut y avoir des mutations. Par exemple, l'insertion d'une cystéine permet la liaison covalente de la protéine à l'or [98]. Différentes liaisons chimiques, dont celle du glutaraldéhyde, ont également été utilisées pour lier des protéines ou les faire interagir avec un substrat [99]. Dans les peptides de synthèse, des acides aminés non-naturels peuvent être insérés pour remplir certaines fonctions chimiques. Arikuma et al ont ainsi créé des peptides alternant alanines et acides α -aminoisobutyric qui s'enroulent en hélices alpha et transfèrent les électrons

par sauts entre les acides aminés modifiés [100]. Des protéines chimères existent également. Elles permettent généralement de coupler les fonctions de deux protéines. Par exemple, la fusion d'une protéine d'intérêt avec la protéine fluorescente verte (GFP) permet de localiser cette protéine d'intérêt par fluorescence [34].

Bien que la prédiction des interactions entre protéines reste quelque chose de très délicat [101], il est possible de façonner des objets entièrement artificiels dans un but précis. Ce sont généralement des peptides qui miment des fonctions biologiques en simplifiant au maximum la séquence peptidique nécessaire.

Des peptides de synthèse peuvent par exemple être sensibles à certaines conditions physico-chimiques (pH, température). La réponse de ces peptides (par exemple un changement de conformation) peut-être détectée et servir de base à un biocapteur [102].

Mais c'est encore dans le domaine de la nanostructuration que les exemples sont les plus nombreux. Plusieurs équipes ont utilisé tantôt les interactions hydrophobes, tantôt les interactions β (liaisons hydrogène) pour former des blocs de bases qui se reconnaissent et s'assemblent. Ces motifs de base ont permis de former des nanotubes [103, 104], des nanofils, et des sphères qui sont les premières étapes vers des assemblages plus complexes [105-108] (Figure 12). D'autres équipes ont réalisé des embranchements ou des coudes [109, 110]. Tous ces travaux permettent de développer les éléments de base qui permettront un jour de faire des structures complexes entièrement auto-organisées.

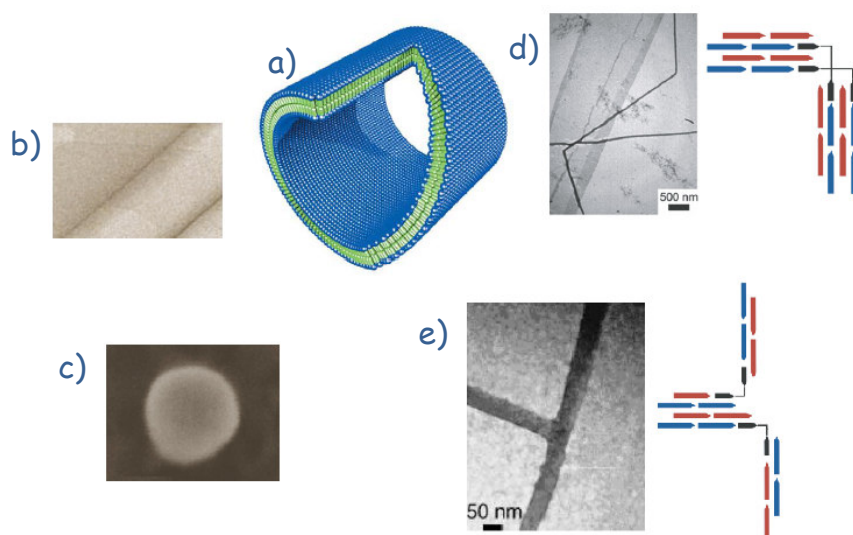


Figure 12 : Différentes constructions basées sur des peptides de synthèse. a) Modèle d'un tube basé sur des peptides amphiphiles [104]. b-c) Tube et sphère basés sur le même principe [106]. d-e) Design de peptides avec une liaison chimique courbée pour faire des embranchements ou des coudes [110].

3 Ce que l'on désire faire

3.1 Le constat

Ce projet part du constat qu'il n'existe actuellement que deux façons d'utiliser les protéines dans des dispositifs technologiques. Il y a les matériaux 100% protéiques qui sont généralement isolés et utilisés en tant que vecteur ou matériau résorbable ; et les matériaux qui utilisent l'auto-assemblage des protéines pour modeler des nouveaux nano objets. Cette deuxième catégorie peut être utilisée dans des dispositifs complexes, mais implique généralement une métallisation. Il n'existe encore aucun dispositif où l'ensemble des fonctionnalités est assuré par des protéines ou autres matériaux organiques biodégradables et/ou biocompatibles. Pour atteindre ce but, il manque un élément essentiel à tout dispositif complexe impliquant de l'électronique : un matériau conducteur. A ce jour, cette fonction est assurée par une métallisation des surfaces ou des objets. Il existe bien d'autres matériaux conducteurs tels que les nanotubes de carbone ou les polymères conducteurs, mais aucun n'apporte de solution satisfaisante en termes de respect de l'environnement et du corps humain.

3.2 Le projet

Nous allons tenter de remplacer la fonction de conduction électrique par une fonction protéique équivalente pour permettre la création de dispositifs exploitant au maximum les fonctionnalités des protéines ainsi que leurs qualités d'éléments biologiques. Dans les organismes vivants, le transfert d'électrons est un mécanisme courant impliquant de nombreuses protéines. Cette fonction peut être canalisée le long d'un support tel qu'une fibre protéique, pour aboutir à la réalisation d'un système de conduction électrique unidimensionnel entièrement fait de protéine.

3.3 Les choix

Pour que ce "nanofil" de protéines soit utilisable dans des applications, nous avons cherché à le faire le plus simple et le plus robuste possible. Le choix de la structure protéique à utiliser s'est donc porté vers les fibres amyloïdes qui sont stables, robustes, et qui ont déjà fait leurs preuves en tant que structure dans différents travaux de recherche. Plus précisément, la protéine utilisée est le domaine prion *het-s* de *podospora anserina* car ses fibres amyloïdes sont bien caractérisées dans la littérature.

Les mêmes raisons sont toujours valables pour le choix de la protéine de transferts d'électrons. D'autres contraintes viennent cependant s'ajouter car il faut que le transfert d'électrons d'une protéine à l'autre soit le plus efficace possible. Le choix final est la rubrédoxine de *methanococcus voltae* en raison de sa robustesse, de sa petite taille, de sa simplicité et de son potentiel isoélectrique quasi-neutre.

Pour la fixation de la protéine sur la fibre amyloïde, nous avons décidé de faire une protéine chimère avec un domaine formant la fibre amyloïde et un domaine assurant le transfert d'électrons (Figure 13). Cela permet d'avoir un lien covalent (donc solide) pour lier les deux protéines et d'assurer une répartition continue des protéines de transferts le long de la fibre amyloïde. De plus, ces protéines peuvent être produites en tant que protéines recombinantes. La fabrication des nanofils ne nécessite donc pas de chimie supplémentaire.

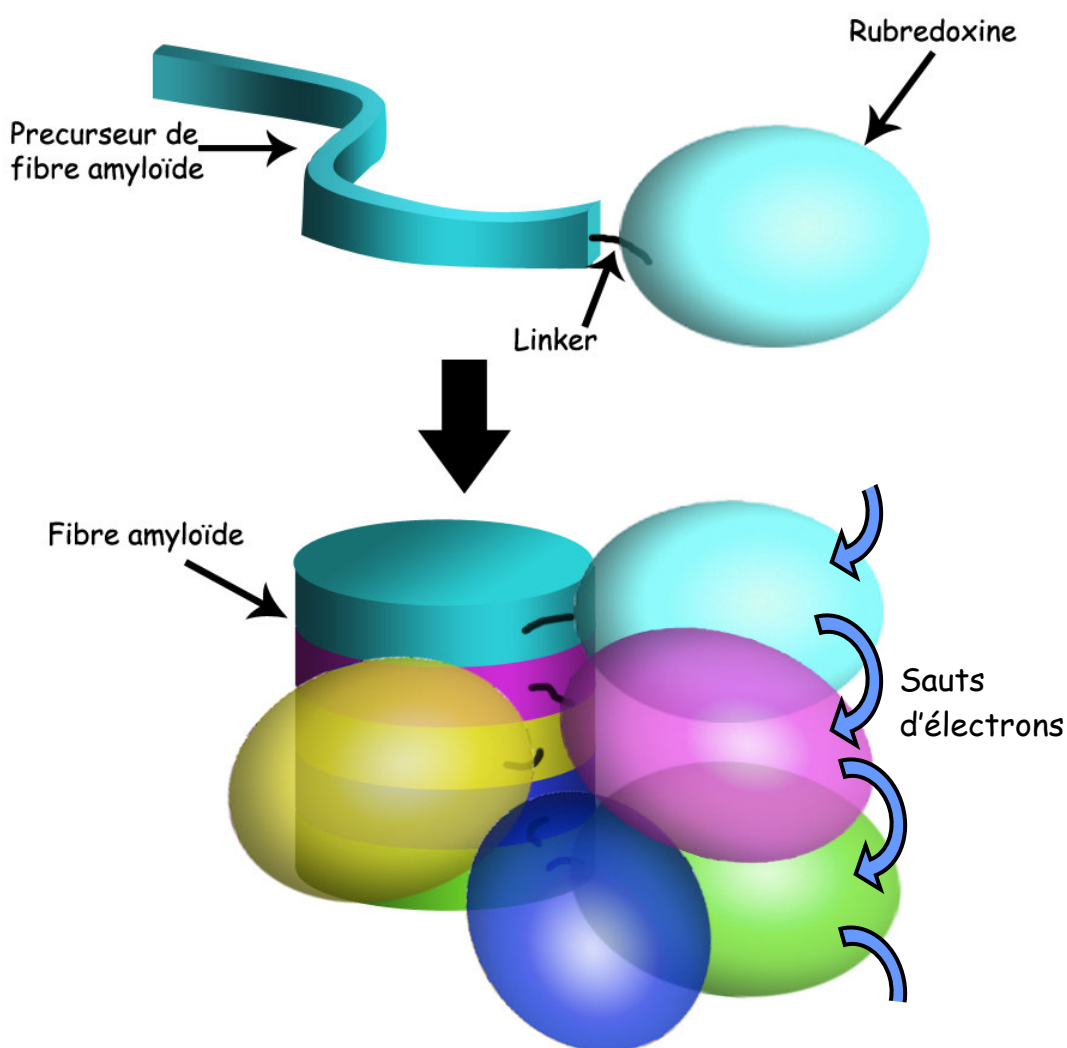


Figure 13 : Schéma de principe du nanofil de protéines.

4 Les fibres amyloïdes

4.1 Leur histoire

Connues d'abord sous la forme d'agrégats, le caractère amyloïde a été défini pour la première fois par Virchow en 1854 lorsqu'il observe un *corpora amylacea* (masse à la fonction mal définie résultant probablement d'une dégénérescence cellulaire) sur un cerveau d'apparence "anormale" (Figure 14). Ce *corpora amylacea* se colore en bleu pâle lors du marquage à l'iode et en violet lors d'un ajout supplémentaire d'acide sulfurique. Il conclut qu'il s'agit de cellulose ou d'amidon (la différence entre les deux entités étant encore mal définie à l'époque) et lui donne le nom d'amyloïde (du grecque ancien *amylon* pour amidon) [111]. Par la suite, les dépôts amyloïdes sont associés à des symptômes cliniques et à une classe de protéines capable d'effectuer un changement de conformation sous forme de fibre (changement de structure secondaire et/ou tertiaire considéré comme un mauvais repliement) [112-114].

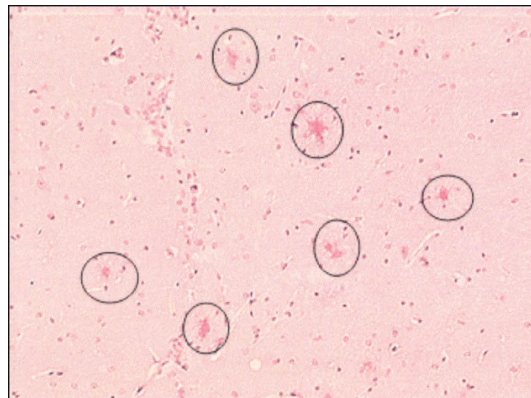


Figure 14 : Agrégats amyloïdes dans une coupe de cerveau de souris [115].

Les techniques évoluant, ces agrégats sont désormais caractérisés par l'exacerbation de la fluorescence de la thioflavine, leur biréfringence lors du marquage au congo red et leur profil de diffraction aux rayons X. Tous ces critères sont révélateurs d'éléments structuraux communs [116-118]. Récemment, la structure amyloïde a gagné en précision et en intérêt en raison de son implication dans de nombreuses maladies neurodégénératives (Maladie d'Alzheimer, de Parkinson, de Huntington) [119-121], qui deviennent des phénomènes de société avec le vieillissement de la population. L'étude des fibres amyloïdes s'est alors étendue en termes de techniques et a permis de découvrir leur implication dans de nombreux phénomènes biologiques. Ces phénomènes sont parfois associés à des pathologies connues ou nouvelles mais pas

seulement. Il a également été découvert que les fibres amyloïdes n'étaient pas systématiquement un mauvais repliement mais pouvaient aussi être une structure native avec une fonctionnalité propre. C'est le cas notamment de certains domaines prions.

Leurs caractéristiques structurales les rendent exploitables pour le développement de nouvelles technologies à l'échelle nanométriques. Le fait qu'elles se forment seules en solution est une qualité importante car l'auto-assemblage est un phénomène recherché pour la nano-structuration d'objets.

4.2 Des éléments de structure

Obtenir une structure à haute résolution des protéines se fait maintenant régulièrement à l'aide de la cristallographie aux rayons X [28, 83, 85]. Malgré les progrès réalisés dans ce domaine, l'obtention de cristaux de protéines est une étape parfois difficile voir impossible; surtout quand les protéines sont insolubles comme les fibres amyloïdes. La résolution de structure par résonance magnétique nucléaire (RMN) n'était possible jusqu'ici que sur des petits objets (inférieure à 50 kDa) [84, 122]. La communauté s'est donc orientée vers d'autres méthodes biophysiques pour extraire des informations sur la structure des fibres amyloïdes. Finalement, la RMN du solide, qui a subi un fort développement cette dernière décennie, a permis d'obtenir des informations de plus en plus fines, jusqu'à la structure haute-résolution [123-127].

4.2.1 La morphologie par microscopie électronique

La microscopie électronique en transmission (TEM) par coloration négative permet d'obtenir une résolution de l'ordre du nanomètre. Si c'est insuffisant pour obtenir des informations sur la structure des protéines, cela permet d'obtenir des informations morphologiques à une échelle beaucoup plus faible que la microscopie optique qui est limitée à $1\mu\text{m}$. Il est ainsi possible de voir que les agrégats amyloïdes sont en fait un entremêlement de fibres allant de 2 à 500 nm de diamètre et de 100 nm à $10\mu\text{m}$ de long [128]. Chacune de ces fibres est elle aussi un assemblage de plusieurs sous fibres appelées "protofibrilles". Il est parfois possible d'observer une périodicité dans le diamètre des fibres amyloïdes qui est révélatrice d'un roulement hélicoïdale de plusieurs protofibrilles à la manière d'une corde [129, 130]. C'est probablement cet enroulement, révélateur d'une chiralité qui est à l'origine du caractère biréfringent des fibres amyloïdes [131]. Une analyse de la périodicité permet d'extraire le nombre de protofibrilles par fibre ainsi que les paramètres de périodicité (Figure 15).

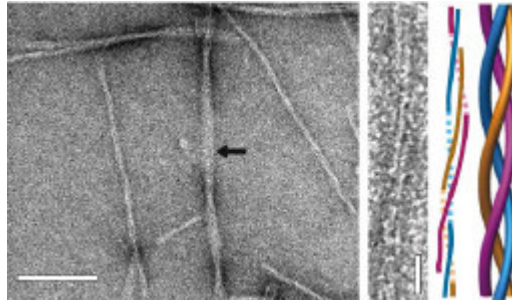


Figure 15 : Image de microscopie électronique d'une fibre amyloïde. Modèle de l'enroulement de trois protofibrilles [130]. (Barres d'échelle = 100 nm et 20 nm)

Le nombre de protofibrilles peut varier selon le pH, ce qui mène à penser que cet enroulement est lié à l'interaction des chaînes latérales [132-134]. En effet, le changement de pH a pour principale conséquence de protoner les chaînes latérales et ainsi de changer la répartition des charges à la surface des protéines, ce qui modifie ses interactions ; celles-ci étant principalement électrostatiques [133, 134].

4.2.2 La spectroscopie infrarouge

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) permet la quantification des structures secondaires des protéines. La bande amide I qui correspond à des nombres d'ondes de 1600 à 1700 cm^{-1} est la plus fréquemment utilisée pour obtenir des informations sur la structure secondaire des protéines. Sur des échantillons amyloïdes, un fort signal dans les zones 1615-1630 et 1670-1680 cm^{-1} est indicateur d'une richesse en feuillets β (Figure 16) [135, 136].

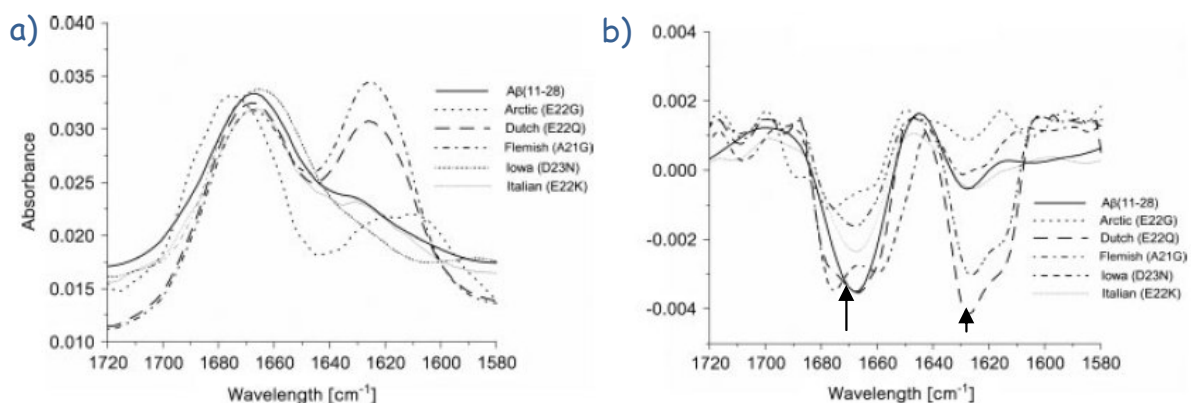


Figure 16 : Spectre d'absorbance infrarouge et sa dérivée seconde pour différentes fibres amyloïdes. Les flèches indiquent les zones d'intérêt [135].

4.2.3 La diffraction aux rayons X

Dans les profils de diffraction aux rayons X typiques des fibres amyloïdes, il y a une raie perpendiculaire à l'axe de la fibre pour une distance de 4,7 Å et une deuxième raie parallèle à l'axe de la fibre pour une distance autour de 10 Å (Figure 17) [137-140]. La première de ces distances peut être reliée à la longueur des liaisons hydrogènes séparant deux brins β . La présence de diffraction indique une répétition régulière de ce motif. La deuxième distance caractérise la distance typique séparant deux protofibrilles. Cette dernière distance est dépendante de l'interaction entre les chaînes latérales des différentes protofibrilles et peut varier de 8 à 10 Å selon la protéine à l'origine des fibres amyloïdes.

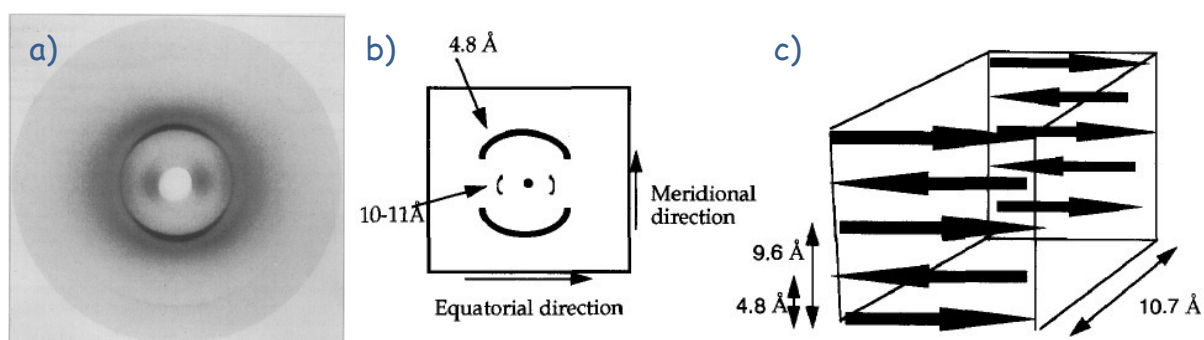


Figure 17 : a) Cliché de diffraction aux rayons X de fibres amyloïdes. b) Schéma simplifié du cliché. c) Schéma d'interprétation de la structure des fibres amyloïdes [140].

Ces différentes études ont permis d'établir les premiers modèles des fibres amyloïdes. Ce sont les interactions β qui sont l'élément structural principal des fibres amyloïdes [116, 117, 121]. Ces interactions, courantes dans la structure tertiaire des protéines, sont stabilisées par des liaisons hydrogène entre différentes parties du squelette protéique. Dans le cadre des fibres amyloïdes, les brins β interviennent perpendiculairement à l'axe de la fibre entre plusieurs protéines identiques (on parle alors de feuillet β intermoléculaires) et permettent ainsi la propagation de la structure sur une distance en théorie infinie. Cette structure est nommée cross β . Chaque protéine apparaît alors comme l'élément de base (ou monomère) d'une longue chaîne polymérique. Ensuite, ces chaînes s'enroulent les unes avec les autres en fibre.

4.2.4 Les structures résolues

Il n'est généralement pas possible de faire cristalliser les fibres amyloïdes pour faire de la diffraction aux rayons X. Cela a tout de même été possible sur les fibres issues du peptide de synthèse KFFEAAKKFFE, qui ont une organisation cristalline [141]. La structure présente

l'organisation cross- β (Figure 18 a). Il s'agit de peptides artificiels simples qui n'ont pas la possibilité d'avoir un cœur hydrophobe par exemple. Cette structure ne nous apprend donc pas grand-chose par rapport à ce qui est connu par d'autres méthodes.

Au cours de la dernière décennie, différents travaux en résonance magnétique nucléaire du solide ont permis d'obtenir des informations structurales de plus en plus fines sur les fibres amyloïdes (Figure 18 b). Des travaux sur le peptide A β ont mené à l'établissement d'un modèle dans lequel une fibre est composée de deux protofibrilles [127]. Chacune de celles-ci est composée de deux feuillets β interagissant par les chaînes latérales. Chaque monomère est composé de deux brins β , faisant chacun parti d'un des feuillets, et étant séparés par une boucle (Figure 18 b).

La RMN du solide a permis d'aboutir à la structure haute résolution du domaine amyloïde de het-s [126] (Figure 18 c). Cette structure s'organise comme un solénoïde dans lequel chaque monomère fait deux boucles. Elle sera détaillée plus tard dans une partie qui lui est propre.

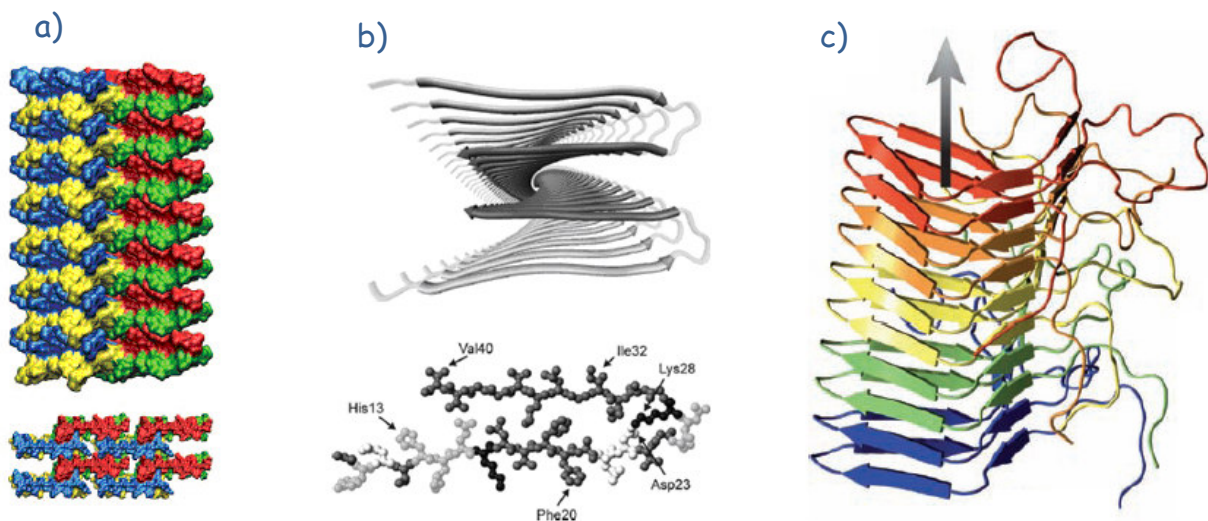


Figure 18 : Structure de fibres amyloïdes. a) Peptide résolu par diffraction aux rayons X sur cristal, vue de côté et de dessus [141]. b) Modèle des fibres de A β vue de l'axe de la fibre, et vue en bâtonnets d'un monomère [127]. c) Structure des fibres de Het-s résolue par RMN du solide [126].

4.3 La stabilité et les propriétés mécaniques

Les fibres amyloïdes sont résistantes aux protéases et stables à des températures plus élevées que la moyenne des protéines. Parfois, la température peut être un facteur accélérant la formation des fibres. Lorsque celles-ci sont issues d'un mauvais repliement, elles sont généralement plus stables que la protéine native [142]. Cette stabilité peut être reliée à un nombre important de

liaisons hydrogène en parallèle qui sont très stabilisantes. Les fibres disposent également d'une structure compacte qui laisse peu de place au solvant pour des attaques chimiques [143].

Différentes études ont été faites sur des fibres amyloïdes issues du peptide A β . L'une d'elles a montré que celles-ci sont résistantes à la déshydratation, mais se fragmentent en plus petites fibres suite à une réhydratation [144]. D'autres études ont visé à modéliser la résistance mécanique de ces fibres [145, 146]. Des mutants ont été étudiés afin de déterminer l'importance relative des différents résidus. L'importance du cœur hydrophobe et des ponts salins a ainsi été mise en évidence.

Plusieurs travaux de recherche ont montré que la stabilité des fibres était généralement affectée dans une moindre mesure lorsqu'elles sont fonctionnalisées avec un autre objet. C'est un aspect important en vue d'applications potentielles [147].

Les propriétés mécaniques des fibres amyloïdes ont également été étudiées par Microscopie à Force Atomique (AFM) sur un ensemble de fibres amyloïdes d'insuline [148]. Après avoir suspendu une fibre amyloïde, la force appliquée par la pointe a été mesurée simultanément avec son déplacement (Figure 19). Cela a permis de mesurer un module d'Young de 3,3 GPa, ce qui est comparable à de la soie et une limite de résistance de 0,6 GPa qui est similaire à l'acier.

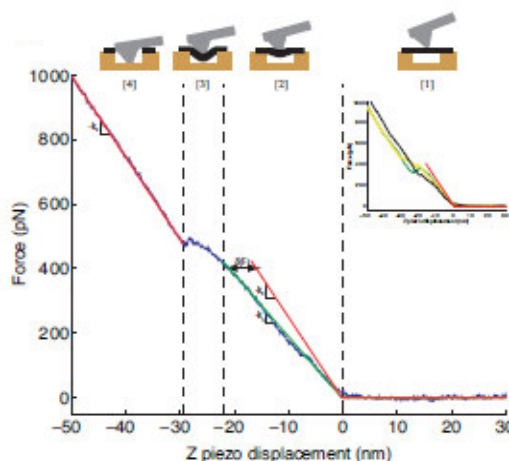


Figure 19 : Courbe présentant les différents régimes de résistance mécanique des fibres amyloïdes d'insuline [148].

Tous ces éléments viennent encourager l'utilisation des fibres amyloïdes en tant que structure pour d'autres applications.

4.4 Les applications

Les caractéristiques mécaniques des fibres amyloïdes, leur stabilité, leurs propriétés d'auto-assemblage, ainsi que leur morphologie proche des nanotubes de carbone en font des objets tout désignés pour des utilisations en nanotechnologies [149]. Le principe est généralement de les utiliser comme une structure qui sera le support (définitif ou temporaire) d'une fonction adaptée à l'application souhaitée. Ces fibres fonctionnelles pourront ensuite être utilisées de manière isolée [93], sur des surfaces nanostructurées [21], ou en interaction les unes avec les autres dans un ensemble d'objets dégageant un comportement global. Le domaine de recherche étant récent, la plupart des équipes de recherche travaillant sur cette thématique en sont encore à la conception des fibres fonctionnelles.

4.4.1 Un support pour l'immobilisation d'enzymes

Pilkington et al ont utilisé les fibres amyloïdes d'insuline comme support pour la glucose oxydase [99]. L'immobilisation a été faite par création d'un lien covalent au glutaraldéhyde entre la glucose oxydase et les fibres formées. Les propriétés antibactériennes de la protéine se retrouvent ainsi immobilisées. En effet, lors d'une utilisation de la glucose oxydase seule, celle-ci diffuse dans le milieu où elle se trouve et rend impossible son utilisation de manière locale.

4.4.2 La croissance cellulaire

Des fibres amyloïdes ont été fonctionnalisées avec un petit peptide arginine-glycine-aspartate (RGD). Cette séquence est issue de la fibronectine, une protéine de la matrice extracellulaire permettant l'adhésion des cellules. Les fibres amyloïdes ainsi formées ont montré leur capacité à servir de support pour la croissance de fibroblastes [93] (Figure 20). Certaines fibres amyloïdes peuvent s'organiser sous forme de gel, matrice standard en ingénierie tissulaire [91, 95]. Les gels de fibres amyloïdes peuvent donc être utilisés à la manière du collagène comme matrice extracellulaire. Ils présentent cependant des caractéristiques mécaniques qui leurs sont propres et pourraient s'avérer avantageux dans certaines conditions. Le collagène forme des gels cassants alors que ceux des fibres amyloïdes sont plus souples.

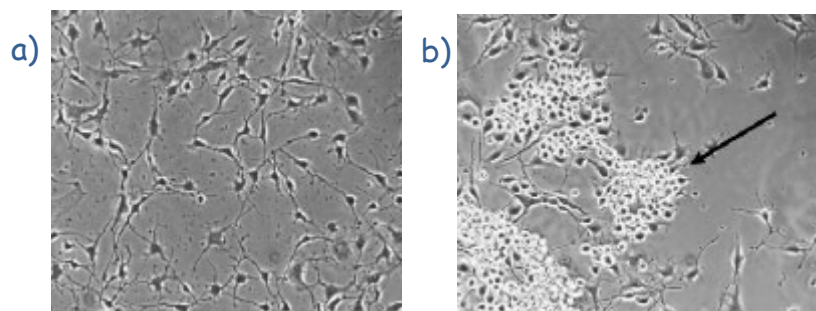


Figure 20 : Comparaison de croissances de fibroblastes 3T3. a) Croissance avec substrat standard. b) Croissance sur fibres fonctionnalisées [93].

4.4.3 Un support pour une étude de repliement

Baldwin et al ont utilisé les fibres formées par le domaine SH3 pour faire des études de repliement des protéines à leur surface [150]. Par les techniques de bio-ingénierie, ils ont créé une protéine chimère comprenant la séquence peptidique du cytochrome c encadrée de part et d'autre de la séquence peptidique du domaine SH3. Les deux domaines SH3 de chaque protéine interagissent ensemble et avec leurs homologues d'autres protéines pour former une fibre amyloïde. La séquence peptidique correspondant au cytochrome c se retrouve liée covalamment à la fibre amyloïde après sa formation. D'abord déplié (perte de structure secondaire et tertiaire), le cytochrome c retrouve sa conformation après l'ajout d'une porphyrine dans l'environnement. Ce cofacteur du cytochrome c joue ainsi un rôle structurant en plus du rôle de transporteur d'électrons par l'intermédiaire d'un atome de fer.

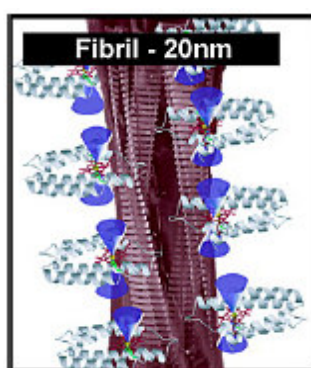


Figure 21 : Représentation d'une fibre amyloïde du domaine SH3 avec le cytochrome c replié à sa surface [150].

Cette étude a abouti à la création d'une fibre amyloïde fonctionnalisée avec le cytochrome c (Figure 21) mais avait pour principal objectif de démontrer la faisabilité de l'objet. La possibilité

que ce type d'objet conduise le courant par sauts électroniques de porphyrine en porphyrine est toute fois évoquée sans être démontrée.

4.4.4 Une liaison streptavidine/biotine

La bio-ingénierie nécessaire à la création d'une protéine chimère n'est pas toujours aisée. De plus, il est plus délicat de purifier et manipuler deux protéines différentes en même temps. Par exemple, la formation des fibres amyloïdes peut requérir des conditions physico-chimiques défavorables à la partie fonctionnelle de la protéine chimère. C'est pourquoi Gazit et al ont développé une technique permettant de lier n'importe quel objet à la surface d'une fibre amyloïde une fois que celle-ci est formée [151]. Le principe de fonctionnalisation repose sur l'affinité streptavidine/biotine qui est très forte. Leur technique consiste en la formation d'une fibre amyloïde à partir d'un peptide. Une biotine modifiée est ensuite liée chimiquement à la surface de la fibre. Ainsi, si une streptavidine est liée à un objet que l'on souhaite voir disposé à la surface de la fibre, la biotine et la streptavidine vont se lier et donc relier cet objet à la fibre. Cette méthode a été réalisée avec des quantum dots comme objet d'intérêt ce qui valide la technique [151]. Ces fibres fonctionnalisées avec d'autres molécules ou protéines pourraient servir dans le domaine des biocapteurs.

4.4.5 Les nanofils conducteurs

Des ensembles parallèles de fibres amyloïdes⁵ peuvent être intrinsèquement conducteurs. Del mercato et al ont pu mesurer une conductivité sur de tels ensembles de 200 nm de diamètre formés à partir de peptides synthétiques [152]. Ils ont mesuré des résistances supérieures au $G\Omega$ et ont montré que celles-ci dépendent de l'humidité dans l'air. Il s'agirait donc de conduction ionique impliquant l'eau et les ions restés prisonniers du faisceau de fibres.

Le principe de la métallisation d'un fil de protéine a déjà été décrit ainsi que les deux techniques pour y parvenir. Chacune d'elle a été réalisée sur les fibres amyloïdes (Figure 22). La réduction de métal à partir d'un nucléateur a été réalisée sur des fibres issues de sup35p et des peptides issus de l'adenovirus [68, 69]. Les fils ainsi formés font 150 à 200 nm de diamètre pour une longueur supérieure à 2 μm . La conductivité de ces nanofils est faible comme celle d'un fil de métal.

⁵ parfois appelés faisceaux, fagots, ou bundles (anglais).

La réduction spontanée a été réalisée sur des fibres issues du lysozyme. Les nanofils font 1 nm de diamètre pour 2 μm de long [66], ce qui est nettement plus fins qu'avec l'autre méthode. Cependant, aucune mesure de résistance n'est donnée. La continuité du métal (indispensable à une conduction électrique) peut donc être mise en doute.

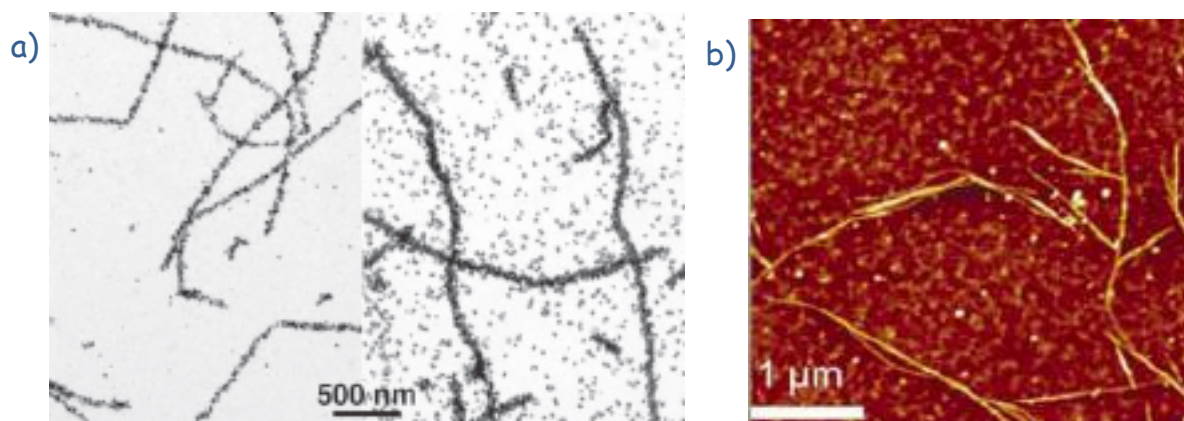


Figure 22 : a) Microscopie électronique des nanofils formés avec nucléateur [68]. b) Image AFM de nanofils formés au cœur de fibres tubulaires [66].

4.5 La protéine het-s

4.5.1 La fonction naturelle

Het-s est une protéine prion issue du champignon filamenteux *podospora anserina* (Figure 23) qui est non-pathogène et qui se trouve notamment sur les crottins de chevaux. Elle est impliquée dans un processus de reconnaissance courant chez ce type d'organisme : l'incompatibilité d'hétérocaryon [153, 154].



Figure 23 : Image du champignon filamenteux *Podospora anserina*.

La reproduction de l'espèce implique une fusion de deux cellules, puis de leur noyau. Cette deuxième étape ne peut se produire qu'en cas de compatibilité des génomes ; qui est elle même contrôlée par divers mécanismes dans lesquels het-s joue un rôle. Trois versions de la protéine existent à l'état naturel, het-s, het-s* et het-S. Les deux premières ont la même séquence peptidique mais présentent des phénotypes différents reliés à des états conformationnels différents. Het-s est un état "prion-infecté" alors que het-s* est neutre mais peut évoluer vers l'état infecté à son contact (ou naturellement avec un temps plus long). Het-S est quand à lui différents des autres de 13 acides aminés et n'est incompatible qu'avec het-s. Il a été montré que le caractère prion-infectieux de het-s correspond à un état sous forme de fibres amyloïdes qui entraîne la mort cellulaire lorsque het-s et het-S se rencontrent. A l'inverse, het-s* est soluble et neutre lors d'une rencontre avec het-S. La forme prion-infectée est donc la forme active de la protéine et non une "maladie" puisque c'est uniquement sous cette forme qu'elle remplit son rôle : empêcher deux individus génétiquement différents de fusionner [155].

Sur les 289 résidus qui composent la protéine, seuls les 71 derniers (coté C-terminal) sont impliqués dans la formation des fibres amyloïdes. Alors que les 218 premiers (côté N-terminal) sont responsables à eux seuls de la fonction d'incompatibilité entre het-s et het-S. La protéine est donc composée de deux domaines : un domaine responsable de la fonction de reconnaissance des génomes incompatibles et un domaine responsable de la formation des fibres amyloïdes qui agit comme un support de la fonction de reconnaissance (Figure 24 b) [155].

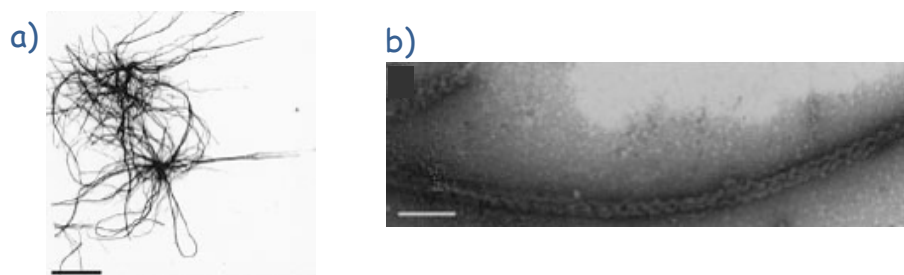


Figure 24 : a) Fibres amyloïdes issues de het-s. (barre d'échelle = 5 μ m) b) Fibre isolée mettant en évidence le domaine de reconnaissance autour de la fibre [153].

4.5.2 L'étude du domaine het-s 218-289

Le domaine het-s 218-289 a été isolé par biologie moléculaire et produit dans *Escherichia Coli* [153]. La protéine peut être stockée à l'état monomérique en étant dénaturée dans l'urée 8 M ou

la guanidine 6M. Un pH inférieur à 3 inhibe également la formation des fibres. Leur polymérisation peut ainsi être déclenchée et étudiée en effectuant un saut de pH.

Etant donné que les fibres amyloïdes sont insolubles, elles peuvent être sédimentées par centrifugation. La cinétique de formation des fibres peut donc être suivie par dosage de la quantité de protéine soluble après centrifugation. Cette quantité décroît exponentiellement jusqu'à zéro au bout de cinq heures. Les temps réels sont probablement plus courts. Il est probable qu'une fraction des protéines soit sous forme de fibres mais reste en suspension si la force de centrifugation n'est pas assez forte.

En comparatif, la technique permet néanmoins d'affirmer plusieurs points : i) Le temps de formation des fibres est plus court pour le domaine 218-289 que pour la protéine entière. Il est probable que la présence d'un extra-domaine gêne un peu l'interaction pour des raisons d'encombrements stériques. ii) La présence d'une faible quantité de fibres amyloïdes déjà formées accélère considérablement la cinétique. Il s'agit là d'un phénomène appelé "seeding" bien connu pour les polymères biologiques. Les premières étapes d'assemblage des monomères sont généralement thermodynamiquement défavorables et mettent du temps. La présence de protéines déjà assemblées permet de passer cette étape. iii) Les actions mécaniques telles que le vortex ou le pipetage accélèrent la cinétique car elles entraînent du seeding en brisant les fibres déjà existantes.

4.5.3 La structure de het-s 218-289

Les différentes fibres amyloïdes issues de het-s ont été observées en microscopie électronique par la technique de coloration négative [130, 156]. Les fibres standards formées à pH7 font 5 nm de diamètre et leur longueur est supérieure à 200 nm (Figure 25 a). Celles-ci sont regroupées en fagots organisés à forte force ionique. Des fibres d'une morphologie différente et plus variée se forment à pH2 sur une échelle de temps plus longue. Il y a généralement un assemblage de plusieurs des fibres observées à pH7 (Tableau 1). Trois fibres peuvent s'enrouler ou s'associer en ruban et ces objets peuvent interagir encore à un niveau supplémentaire. Les fibres formées à pH 3,9 et 3,3 sont généralement des fibres seules mais peuvent parfois faire des doublets ou triplets. Un autre type de fibre a également été observé en urée à très haute concentration de protéine.

Tableau 1 : Tableau récapitulatif du nombre de protofibrilles en fonction du pH [130].

Construct and conditions	Mass per unit length	Relative amounts of each observed species	Subunits/0.94 nm (for multiple fibrils, measured density was divided by number of singlet fibrils)
	<i>kDa/nm</i>	%	
HET-s-(218–289), pH 7.4	9.20 ± 1.44 ^a (singlet)	100.0	1.02 ± 0.16
HET-s-(157–289), pH 7.4	13.80 ± 2.02 (singlet)	88.8	0.85 ± 0.13
	30.47 ± 3.73 (doublet)	10.0	0.95 ± 0.16
	39.79 ± 1.02 (triplet)	1.2	0.82 ± 0.03
HET-s-(218–289), pH 3.9	9.00 ± 1.53 (singlet)	86.3	0.99 ± 0.17
	17.50 ± 2.50 (doublet)	12.7	0.97 ± 0.20
	24.70 ± 1.93 (triplet)	1.0	0.91 ± 0.12
HET-s-(218–289), pH 3.3	9.52 ± 1.18 (singlet)	92.7	1.05 ± 0.13
	18.79 ± 2.57 (doublet)	5.5	1.04 ± 0.20
	24.85 ± 1.75 (triplet)	1.8	0.91 ± 0.11
HET-s-(218–289), pH 2.0	8.60 ± 1.97 (singlet)	0.0	0.95 ± 0.22 ^b
	17.19 ± 2.79 (doublet)	0.8	
	25.79 ± 3.42 (triplet)	75.8	
	34.39 ± 3.95 (quadruplet)	0.1	
	42.98 ± 4.41 (quintuplet)	2.6	
	51.58 ± 4.83 (sextuplet)	18.4	
	60.18 ± 5.22 (septuplet)	2.3	

La structure haute-résolution du domaine het-s 218-289 a été résolue en 2008 par RMN du solide [126, 157, 158]. La Figure 25 b) représente cinq monomères d'une fibre. Elle se structure à la façon d'un solénoïde dont chaque monomère effectue deux boucles. Chaque boucle interagit avec ses voisines via les interactions hydrogènes de quatre feuillets β perpendiculaires à l'axe de la fibre (structure cross β). Un monomère étant composé de deux boucles, il contribue à la longueur de la fibre à hauteur de deux brins β soit 9,4 Å. Une légère rotation de la fibre autour de son axe est présente. Cela correspond à la chiralité classiquement observée pour les fibres amyloïdes.

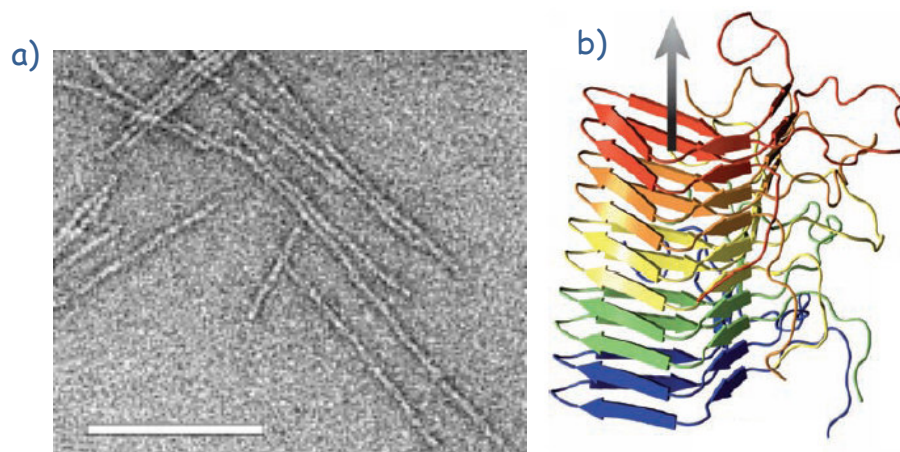


Figure 25 : a) Image de microscopie électronique des fibres amyloïdes formées par het-s 218-289 [130]. (barre d'échelle=50nm) b) Structure haute-résolution réalisée par RMN du solide [126]. Cinq monomères sont représentés dans des couleurs différentes.

On peut remarquer que l'extrémité N-terminale de la structure s'éloigne de la fibre. Cela est cohérent avec la présence d'un autre domaine qui n'empêche pas la fibre de se former.

De nombreux éléments viennent stabiliser cette structure et sont listés dans le tableau ci-dessous. Outre les liaisons hydrogènes des brins β , il y a un cœur hydrophobe à l'intérieur du solénoïde, des échelles d'asparagine (liaisons H) et des ponts salins (électrostatiques) qui sont des éléments reconnus comme stabilisants pour une protéine (Tableau 2) [83, 143, 159-161].

Tableau 2 : Tableau récapitulatif des éléments structuraux stabilisants des fibres amyloïdes de het-s.

types d'interaction	résidus impliqués
feuillet β 1	N226 - K229 avec N262 - E265
feuillet β 2	D230 - E234 avec T266 - K270
feuillet β 3	K236 - L241 avec E272 - I277
feuillet β 4	N243 - T246 avec N279 - G282
résidus hydrophobes	A228 , I231 , A237 , V239 , L241 V264 , V267 , V275 , I277
ponts salins	K229 & E265 , E234 & K270 K236 & E272
échelle asparagine	N226 & N262

5 Le transfert d'électrons

5.1 Les phénomènes électriques en biologie

Par phénomènes électriques, on entend tous les mécanismes impliquant les notions de charge électrique, de potentiel ou de courant.

5.1.1 La conduction intrinsèque des protéines

Les protéines sont des chaînes organiques saturées à l'exception de quelques acides aminés (voir 5.2.3). Il ne peut donc pas y avoir de conduction par des électrons délocalisés le long de celles-ci comme cela se fait dans les polymères conducteurs [162]. Cependant, une équipe a démontré que des faisceaux de fibres amyloïdes pouvaient conduire l'électricité naturellement, sans qu'aucune modification ne leurs soit apportée [152]. La même équipe a montré que cela peut se produire avec d'autres protéines déposées en fine couche [163]. La structure amyloïde n'est donc

pas requise pour ce type de transfert. Dans les différents cas répertoriés, la conduction électrique est fortement impactée par l'hydrométrie de l'air ambiant. Une hypothèse avancée pour expliquer cette conduction, est qu'elle serait ionique car il est fort probable que des ions et des molécules d'eau se retrouvent emprisonnés dans les structures protéiques.

5.1.2 Les neurones

L'évocation des phénomènes électriques se produisant dans le vivant, fait immédiatement penser aux neurones. Le mécanisme impliqué est une dépolarisation de la membrane qui intervient de manière locale grâce à l'ouverture de canaux ioniques (Figure 26) [164]. Le changement de polarité locale permet l'ouverture des canaux voisins et le phénomène se propage ainsi de proche en proche. Cela s'apparente donc plus à un phénomène ondulatoire qu'à de la conduction. Tout au plus, il existe un courant ionique local lorsque les ions passent d'un côté à l'autre de la membrane. Exploiter ce qu'il se passe dans les neurones n'est donc pas pertinent pour notre projet.

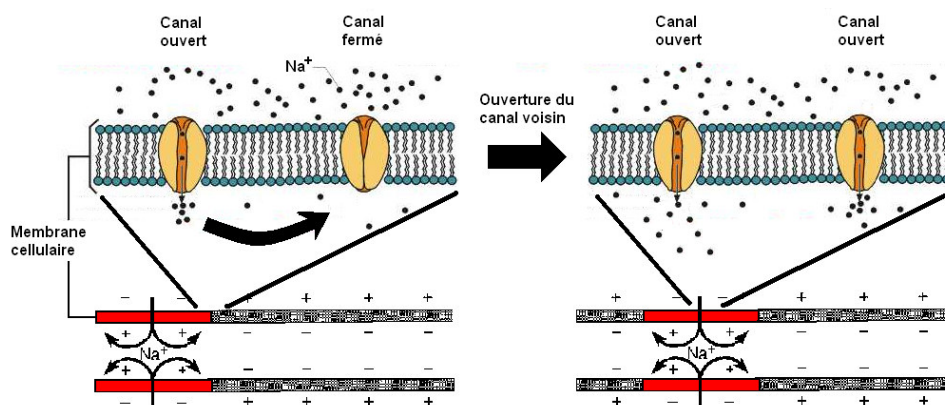


Figure 26 : Schéma du principe de la propagation de la dépolarisation membranaire dans les neurones.

5.1.3 Les nanofils bactériens exogènes

Une certaine catégorie de bactéries nommée “dissimilatory metal reducing bacteria” (DMRB) possède la capacité de créer des liens conducteurs d'électricité entre bactéries dans des conditions anaérobiques [165-167]. Il semblerait que ce mécanisme ait pour but d'acheminer les électrons issus de la respiration (habituellement captés par l'oxygène) vers la périphérie de la colonie où ils pourront être évacués par d'autres éléments comme le fer ou le manganèse. La structure de ces nanofils n'est pas encore connue. Des souches mutantes de *Shewanella oneidensis* n'étant pas capables d'exprimer les cytochromes c MtrC ou OmcA, peuvent fabriquer

des filaments morphologiquement identiques mais ceux-ci ne sont pas conducteurs [166]. Un modèle possible serait un tube protéique possédant en son cœur une série de cytochromes c. Cette protéine liant un atome de fer par l'intermédiaire d'une porphyrine effectuerait alors des transferts successifs d'électrons d'un bout à l'autre du tube. Il n'existe pour l'instant aucune preuve concrète de ce modèle.

La résistance ohmique des fils de *Shewanella oneidensis* a été directement mesurée entre deux électrodes et par AFM conducteur [165]. Celle-ci était de 386 M Ω , ce qui correspond à 10^9 transferts d'électrons par seconde pour une différence de potentiel de 100 mV. La conductivité de ces fils a été estimée à 1 Ω .cm, ce qui est similaire à du silicium dopé.

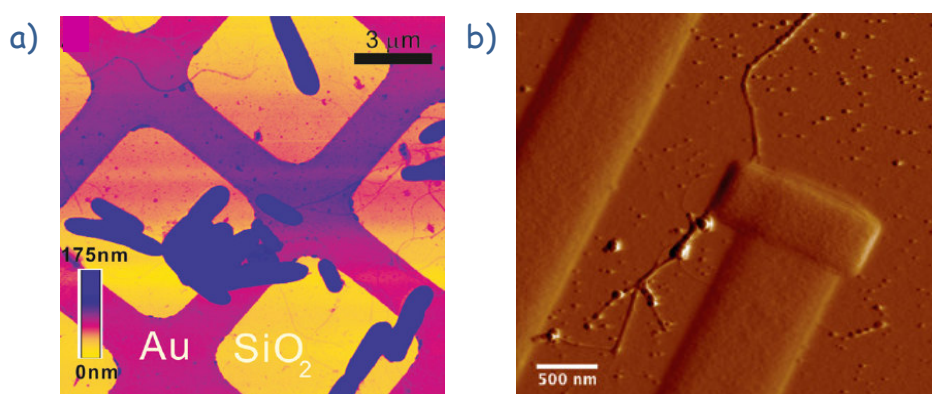


Figure 27 : a) Image AFM des bactéries *Shewanella oneidensis* et des filaments s'en échappant. b) Image MEB d'un filament entre deux électrodes pour faire de la mesure de courant [165].

5.1.4 Les transferts redox

Le transfert d'électrons via les systèmes redox est extrêmement courant dans les organismes vivants et notamment dans le cycle de la respiration (cycle de Krebs). Par exemple, la Figure 28 montre que ce cycle implique plusieurs fois une oxydation des métabolites intermédiaires combinée à une réduction du NAD⁺ en NADH. La régénération du NAD⁺ nécessite elle aussi les transferts successifs du NADH à une ubiquinone (Q), ensuite de QH₂ au cytochrome c et finalement à l'oxygène (Figure 28 b). Cette suite de réaction peut varier selon l'organisme et l'environnement, et chacune des étapes implique des enzymes spécifiques impliquées dans le transfert d'électrons (Complexes I à IV).

Cet exemple permet d'illustrer simplement l'importance du transfert d'électrons ainsi que la diversité de ces acteurs. Ces derniers vont être présentés après avoir donné quelques notions théoriques sur les transferts redox.

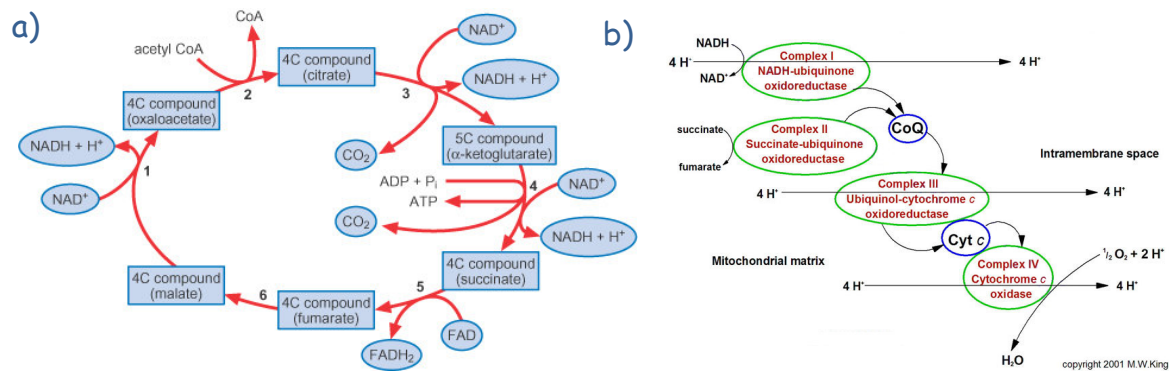
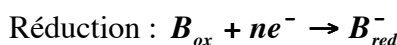
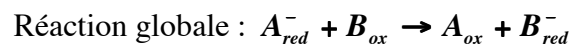
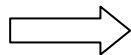
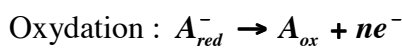


Figure 28 : a) Cycle de la respiration. b) Régénération du NAD⁺ par une cascade de transferts redox ⁶.

5.2 Les échanges redox dans les protéines

5.2.1 La physico-chimie des réactions redox

Une réaction d'oxydoréduction (aussi appelée réaction redox) est une réaction chimique durant laquelle intervient un transfert d'électron(s) d'un réducteur vers un oxydant. Ce genre de réaction se décompose généralement en deux demi-réactions. Il y a l'oxydation où l'espèce A réduite (A_{red}^-) devient oxydée (A_{ox}) et voit sa charge augmenter tandis qu'elle libère un ou plusieurs électrons. L'autre demi-réaction est la réduction, où l'espèce B oxydée (B_{ox}) capte un ou plusieurs électrons et diminue donc sa charge. C'est alors une espèce réduite (B_{red}^-).



Afin de bien comprendre le fonctionnement de ces réactions, considérons dans un premier temps une seule espèce présente en solution. Le potentiel électrique de la solution est relié à l'équilibre entre espèces réduites et oxydées par la loi de Nernst :

$$E = E_A^0 + \frac{k_b T}{nq} \ln \left(\frac{[A_{ox}]}{[A_{red}^-]} \right)$$

Eq 1

⁶ Royal Society of Chemistry : <http://www.rsc.org/Education/Teachers/Resources/cfb/respiration.htm>

<http://themedicalbiochemistrypage.org/oxidative-phosphorylation.html>

Où :

E est le potentiel de la solution,

E_A^0 est le potentiel électrochimique caractéristique du couple redox A_{ox} / A_{red}^- ,

k_b est la constante de Boltzmann,

T est la température exprimée en °K,

n est le nombre d'électrons échangés,

q est la charge de l'électron,

$[A_{ox}]$ et $[A_{red}^-]$ sont les concentrations molaires respectives des espèces A_{ox} et A_{red}^- .

Le potentiel électrochimique d'un couple redox E^0 est une donnée empirique mesurable pour un couple oxydant/réducteur donné et dans des conditions données de pression, pH et température.

En considérant que la concentration en espèce A, $[A] = [A_{ox}] + [A_{red}^-]$, est constante, cela donne :

$$\frac{[A_{ox}]}{[A]} = \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{-nq(E - E_A^0)}{k_b T}\right)} \quad \text{Eq 2}$$

L'équation implique que lorsque le potentiel en solution E est supérieur au potentiel électrochimique d'un couple redox, l'équilibre est déplacé en faveur de l'espèce oxydée. Et inversement, l'espèce réduite est favorisée lorsque le potentiel est inférieur au potentiel électrochimique.

La modification du potentiel implique la présence d'autres espèces agissant elles aussi sur les échanges d'électrons. En effet, il faut savoir que l'étude d'une demi-réaction est quelque chose d'incomplet car les électrons ne restent pas seuls en solution. La perte d'un électron lors d'une oxydation s'accompagne nécessairement de la reprise de cet électron par une autre entité. Autrement dit, lorsqu'il y a un donneur d'électron, c'est qu'il y a un accepteur et inversement.

Lorsqu'il y a plusieurs espèces redox en solution, un raisonnement en termes d'énergies permet de savoir qui est accepteur ou donneur d'électron(s). Une entité chargée comme un électron va chercher à minimiser son énergie $\mathcal{E} = qE$. Sa charge q étant négative il va naturellement

chercher à atteindre le plus haut potentiel. Il en résulte donc que le réducteur du couple au potentiel électrochimique le plus bas, va céder son électron (et devenir oxydé) à l'oxydant du couple au potentiel électrochimique le plus haut (qui deviendra réduit). Une représentation des couples sur une échelle de potentiel permet de visualiser l'équation finale grâce à la règle du "gamma" (Figure 29).

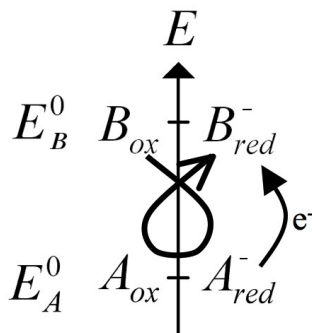


Figure 29 : Représentation des couples redox sur une échelle de potentiel. Le dessin d'un gamma aide à la détermination du sens de réaction. Le ou les électron(s) échangé(s) monte(nt) en potentiel.

Une électrode peut être considérée comme un couple redox dont le potentiel peut être ajusté. Ainsi, elle se retrouvera donneur ou accepteur d'électrons selon que son potentiel est supérieur ou inférieur au potentiel électrochimique du couple redox avec lequel elle échange.

5.2.2 Les transferts redox dans les protéines

La réaction redox est le moyen principal des protéines pour échanger des électrons. Il met généralement en œuvre des métaux de transition qui sont principalement le fer, le cuivre mais peuvent aussi être le nickel, le ruthénium, le molybdène, ou le vanadium. Ils sont généralement organisés en centres de un ou plusieurs atomes métalliques mêlant parfois des atomes de soufre. Ces centres sont complexés dans les protéines par des ligands grâce à des liaisons de coordination (exemple d'une protéine à cuivre de type I en Figure 30).

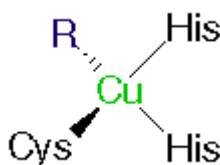


Figure 30 : Représentation chimique d'un atome de cuivre complexé par des ligands protéiques (R étant variable).

Il n'y a pas de liaison métallique établie entre le métal et l'élément avec lequel il doit échanger un ou plusieurs électron(s). Il y a donc toujours une distance physique entre les deux acteurs de la réaction. Cela constitue une barrière énergétique que les électrons franchissent par des "sauts" (hopping en anglais). Ce saut est effectué par effet tunnel. L'énergie thermique joue également un rôle car elle confère aux électrons une énergie supplémentaire pour passer la barrière.

Différents modèles ont été proposés pour la vitesse de transfert (nombre de transferts par seconde). Ces modèles font ressortir trois paramètres : i) la barrière énergétique entre donneur et accepteur, ii) la force motrice du transfert ou différence d'enthalpie libre ΔG , qui est reliée à la différence de potentiel entre le donneur et l'accepteur, iii) la capacité des donneur et accepteur à réorganiser leur environnement électronique [168-170]. La température n'apparaît pas directement dans ces différents termes. Etant constante dans les expériences de biochimie, elle apparaît en fait dans les diverses constantes des équations. C'est pourtant un aspect important car c'est un apport d'énergie pour les électrons qui est parfois nécessaire pour effectuer certains sauts.

La barrière énergétique est un paramètre variable alors que les autres sont intrinsèques au système (à température constante). Selon les différents modèles, la vitesse de transfert est proportionnelle à $e^{-\beta R}$ où β est proportionnel à la racine carrée de la hauteur de la barrière de potentiel, et R est la distance entre donneur et accepteur. Une revue des β connus pour les échanges entre protéines donne une valeur de $1,4 \pm 0,2 \text{ \AA}^{-1}$, ce qui est intermédiaire entre les complexes chimiques ($\beta \approx 0,9 \text{ \AA}^{-1}$) et le vide ($\beta = 2,8 \text{ à } 3,5 \text{ \AA}^{-1}$) [168]. Cela implique une chute de la vitesse de transfert de 75% lorsque la distance entre donneur et accepteur d'électrons s'accroît de un angström. Les transferts connus dans les protéines se font tous sur des distances inférieures à 14 Å (Figure 31).⁷

Il est également connu que les transferts d'électrons sont généralement couplés à des mouvements de protons dans les protéines. Ces mouvements conjoints souvent essentiels ont un

⁷ Deux exceptions à cette règle existent : une sulphyte oxydase et une desulphoferrodoxin. Dans la première, une grande flexibilité entre le domaine de l'accepteur et celui du donneur remet en cause la distance de 27 Å. Dans le deuxième cas, aucune preuve d'un transfert effectif n'a encore été donnée. Il est donc probable que les centres fer en question n'échangent pas d'électrons.

impact sur la réorganisation des environnements électroniques. Ils peuvent être proches ou éloignés des mouvements d'électrons dans l'espace et le temps [171].

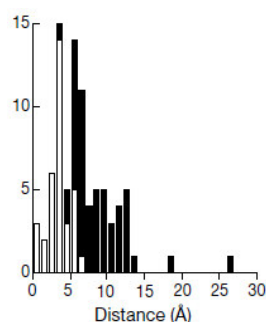


Figure 31 : Dispersion des distances de transfert pour les protéines dont la structure est connue [168].

Cependant, il est courant que les protéines aient à transporter les électrons à l'intérieur d'elles-mêmes sur des distances nettement supérieures à 14 Å. Elles utilisent pour cela des transferts en cascade par sauts successifs inférieurs à 14 Å. Chacun des transferts doit être favorable énergiquement. Les chaînes de centres redox ont donc généralement des potentiels électrochimiques croissants.

L'exemple de l'hydrogénase Nickel-Fer de *desulfovibrio-gigas*, met en jeu deux centres 4Fe-4s, un centre 3Fe-4S, un centre Ni-Fe et un hème [28]. Par une succession de sauts électroniques, un électron peut s'écouler du centre Ni-Fe à l'hème dans une cascade de potentiels sur une distance dépassant 50 Å [168]. Le diagramme énergétique de la Figure 32 montre que la cascade n'est pas parfaite. Il existe une étape endo-énergétique, c'est-à-dire qu'elle nécessite un apport d'énergie qui peut se faire sous la forme d'absorption de photon ou de phonon (énergie thermique). Cela n'empêche pas les électrons d'être transférés d'un côté à l'autre de la protéine avec une vitesse de $2 \cdot 10^7$ transferts par seconde, ce qui est trois ordres de grandeur supérieur à l'activité catalytique de la protéine.

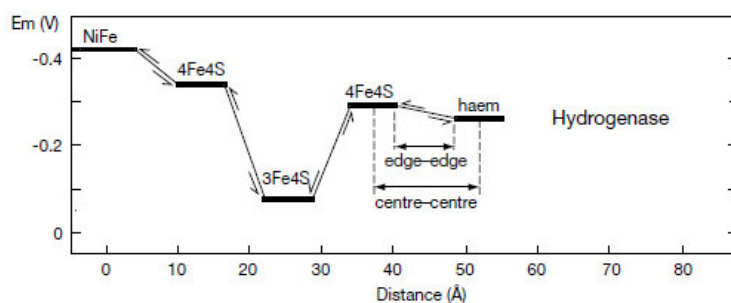


Figure 32 : Diagramme énergétique des différents transferts électroniques se produisant dans l'hydrogénase Ni-Fe de *desulfovibrio gigas* [168].

5.2.3 Le rôle des résidus aromatiques

Le transfert électronique le long des chaînes organiques n'est possible que s'il y a présence d'électrons faiblement liés et délocalisables comme dans les liaisons σ . Cela correspond aux doubles liaisons dans les chaînes carbonées insaturées et aux cycles aromatiques. Il n'y a que des chaînes carbonées saturées dans les protéines (sans double liaison), mais il y a quelques acides aminés qui contiennent des cycles aromatiques : tryptophane, tyrosine et phenylalanine. Il a été montré à plusieurs reprises que ces résidus pouvaient jouer un rôle crucial dans le transfert d'électrons à l'intérieur d'une protéine, avec d'autres protéines ou avec des molécules. Ils permettent de diminuer la barrière énergétique entre un accepteur et un donneur d'électrons car ils exposent un environnement électronique favorable au transfert d'électrons [172, 173].

La photolyase par exemple, possède trois tryptophanes proches dans sa structure. De nombreuses études ont montré que cette chaîne sert de support pour transférer des électrons d'une molécule photosensible (le MTHF) au FADH qui constitue le site actif (Figure 33). La vitesse de transfert dans ce type de système peut atteindre 10^6 transferts par seconde [174, 175].

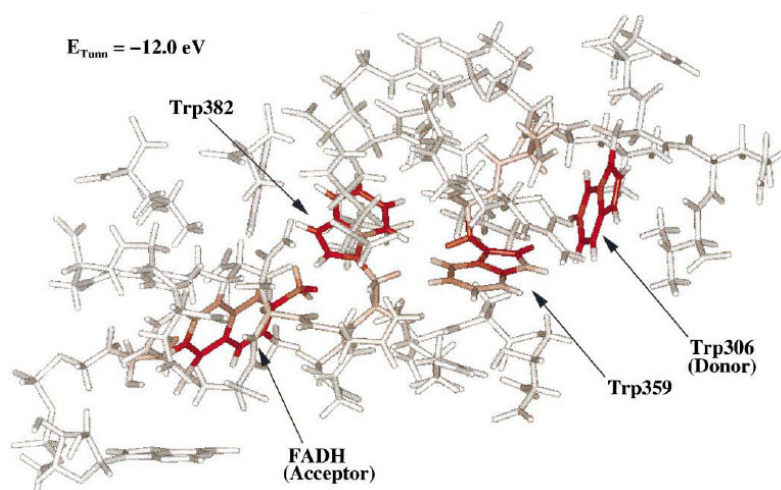


Figure 33 : Structure de la photolyase mettant en évidence la chaîne de tryptophanes [175].

Il a également été mis en évidence que les mouvements de protons couplés jouent un rôle important dans ce type de transfert [176].

5.2.4 Les protéines redox pour des applications

Les protéines impliquées dans le transfert d'électrons sont une cible idéale pour des applications dans les biocapteurs car les électrons peuvent être directement récupérés par une électrode. La

transduction avec l'électronique est donc facilitée comme dans le cas précédemment cité du glucose et de la glucose oxydase [31, 177, 178].

5.3 La classification des protéines redox

5.3.1 Les flavoprotéines

Les flavoprotéines utilisent généralement la FMN (Flavine MonoNucléotide) ou la FAD (Flavine Adénine Dinucléotide) comme cofacteur (Figure 34). Elles effectuent des oxydo-reductions entre deux substrats. Un cycle catalytique se décompose en deux étapes : la réduction de la flavine par un agent réducteur et sa ré-oxydation par un agent oxydant. Il s'agit d'un des rares transferts redox ne mettant par en jeu un métal de transition. L'acceptation (ou la perte) d'un électron est couplée à l'acceptation (ou la perte) d'un H^+ . Plusieurs flavoprotéines peuvent agir séquentiellement dans le même cycle de réaction.

Le type de substrat impliqué permet de séparer les flavoprotéines en cinq catégories :

- les transhydrogénases qui impliquent le transfert de deux électrons équivalents d'un substrat à un autre.
- les déshydrogénases-oxydases qui impliquent le transfert de deux électrons d'un substrat à la flavine ; laquelle est ensuite ré-oxydée par l'oxygène (lequel est réduit en H_2O_2).
- les déshydrogénase mono-oxygénases où la flavine est réduite et la ré-oxydation fait intervenir l'oxygène dont un des atomes part sur un co-substrat, et l'autre est réduit en H_2O .
- les déshydrogénase-électron transférase où la flavine est généralement réduite par deux électrons d'un substrat et ré-oxydée en deux fois par des accepteurs d'électron. Mais l'inverse est également possible : réduction en deux étapes et transfert des deux électrons à un seul substrat.
- l'électron transférase qui catalyse le transfert mono électronique d'une enzyme à une autre.

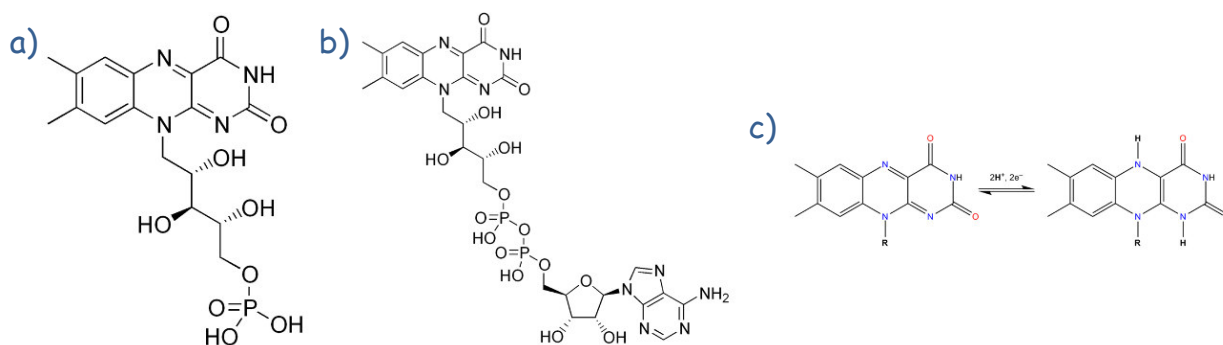


Figure 34 : Représentations chimiques de a) la FMN, b) la FAD et c) des sites d'acceptation d'électrons et de protons.

5.3.2 Les cytochromes : protéines hémiques

L'hème est un cofacteur composé d'une porphyrine liant un atome de Fer. Ce dernier peut avoir les états d'oxydation +II ou +III (de façon intermédiaire +IV). Les transitions entre ces différents états d'oxydation permettent d'accepter ou de donner des électrons à un substrat. Parmi les différentes protéines liant l'hème, les cytochromes sont spécifiquement employés au transfert d'électron (Figure 35). Ils sont classés en quatre catégories (notées de *a* à *d*), qui sont différenciées par le type de porphyrine (a ou b) où l'interaction avec elle. Il existe des sous classifications séparant les protéines en fonction de leur organisme ou de leurs propriétés spectroscopiques mais celles-ci ne sont pas encore bien définies.

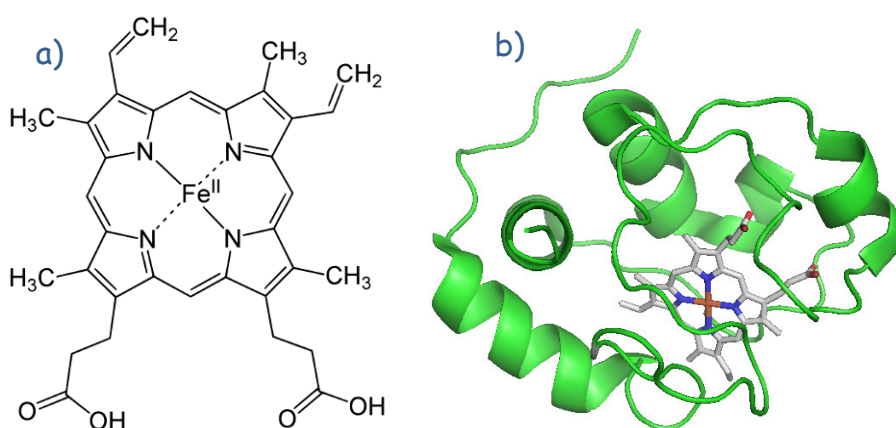


Figure 35 : a) Hème de type b. b) Représentation du cytochrome c (PDB 2YK3)

5.3.3 Les protéines non-hémiques

Les autres processus d'échanges d'électrons présents dans la nature impliquent des réactions d'oxydo-réduction qui font également intervenir des métaux comme le fer. Mais dans les protéines non-hémiques, ces atomes métalliques interagissent directement avec la protéine par l'intermédiaire de résidus spécifiques. Ces cofacteurs sont appelés centres ou clusters et peuvent être mono ou polynucléaires.

Les protéines à centres fer-soufre

Les protéines à centres fer-soufre sont les protéines de transfert électronique non-hémiques les plus courantes. Il en existe plus de 100 chez *E. Coli* et elles sont présentes chez tous les organismes vivants. Les centres fer-soufre les plus courants sont les 2Fe-2S, les 3Fe-4S et 4Fe-4S (Figure 36 a) mais il existe également des centres à deux atomes de fer, ou des centres

impliquant d'autres métaux comme le nickel ou le molybdène. Ces protéines occupent principalement la fonction de transporteur d'électron⁸ (protéines nommées ferredoxines) ou une fonction enzymatique (ex : les hydrogénases) [20, 179-181].

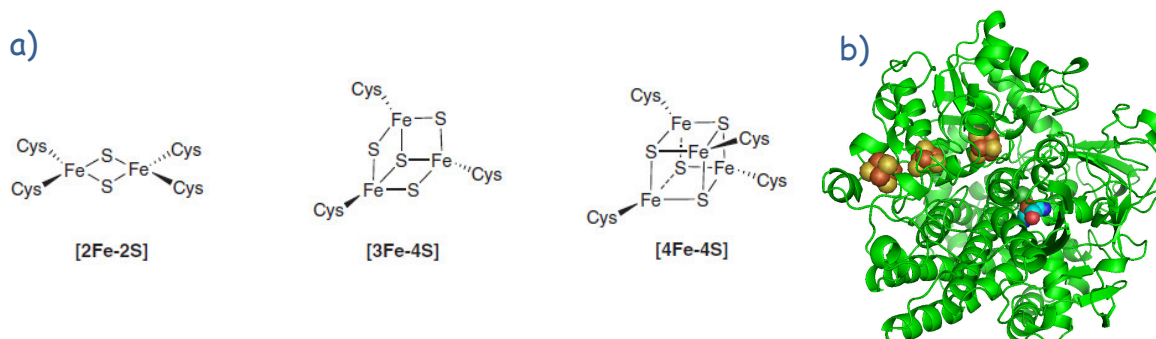


Figure 36 : a) Principaux centres Fe-S [20]. b) Structure d'une hydrogénase contenant un centre Ni-Fe, deux centres 4 Fe-4S et un centre 3Fe-4S (pdb 2FRV).

Les centres fer-soufre sont le plus souvent liés par des résidus cystéine, mais peuvent aussi l'être par des histidines, des arginines, des aspartates, des tyrosines ou des glutamines. Les centres 2Fe-2S et 3Fe-4S effectuent du transfert mono-électronique alors que les 4Fe-4S sont impliqués dans des chimies plus complexes. La gamme de potentiel redox est très large et varie de -500 à +500 mV. De nombreuses protéines impliquent différents clusters fer-soufre, ce qui permet de transférer les électrons sur de grandes distances.

L'hydrogénase de *Desulfovibrio Gigas* précédemment citée est un exemple de la complexité et en même temps des possibilités présentes chez les protéines à centres fer-soufre (Figure 36 b).

Les rubrédoxines

Un centre fer consiste en la coordination d'un unique atome de fer par quatre ligands cystéines dans une conformation tétraédrique. Ces centres se retrouvent dans des petites protéines globulaires appelées rubrédoxines qui possèdent généralement un seul centre fer⁹ [181-183]. Leur séquence possède généralement 50 à 54 résidus et leur potentiel redox est typiquement dans la gamme -100/+50 mV. Ce sont généralement des protéines "acides" avec un pI proche de 4.

⁸ Attention à faire la différence entre le transfert d'électrons, et le transport d'électrons. Le second consiste à acheminer un électron physiquement d'un endroit à un autre.

⁹ Il existe quelques rubrédoxines possédant deux centres fer mais cette catégorie est marginale et ne sera pas détaillée ici.

Les structures haute-résolution de plusieurs rubrédoxines sont connues et montrent de faibles variations [183]. Elles comprennent un feuillet β composé de trois brins (résidus 4-6, 12-14, 49-51), deux petites hélices alpha, deux boucles portant le site de liaison de l'atome de fer, ainsi qu'une autre boucle (en bleu ciel dans la Figure 37). Cette dernière peut être supprimée, ce qui donne une version courte de la protéine (44 à 46 acides aminés) (Figure 37 b). La structure est stabilisée par la présence d'un cœur d'aromatiques et d'un petit patch hydrophobe. La liaison de l'atome de fer stabilise également la structure.

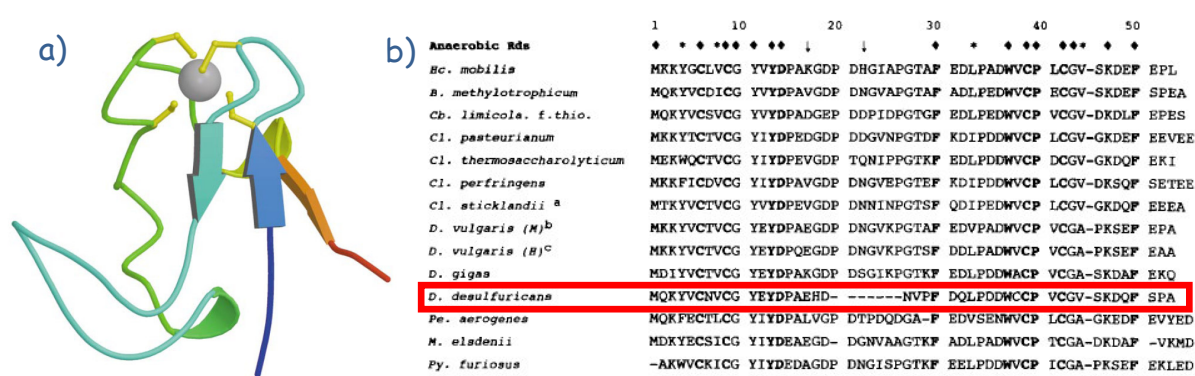


Figure 37 : a) Représentation cartoon de la structure d'une rubrédoxine. b) Alignement de séquence de différentes rubrédoxines. La rubrédoxine de *Desulfovibrio desulfuricans* présente une délétion [184].

Les liaisons Fer-cystéine absorbent dans le visible et/ou l'UV proche selon l'état d'oxydation du fer. Un spectre d'absorption d'une rubrédoxine à l'état oxydé possède des maxima caractéristiques à 350, 380, 490, 570 et 750 nm en plus de la contribution des aromatiques à 280 nm (Figure 38 a). L'état réduit possède des maxima d'absorption à 311, 331 et 280 nm [185].

Le fer à l'état oxydé peut être observé en Résonance Paramagnétique Electronique (RPE). Cette technique permet de caractériser les systèmes de spin demi-entiers à travers leur facteur g (plus de détails sur la technique dans la Partie 1). En bande X, la dérivée du spectre présente un signal anisotrope pour un facteur g de 9,3 ; et d'autres signaux vers un facteur g de 4,3. Le premier correspond à un état fondamental et diminue avec la température au profit des autres (Figure 38 b) [186, 187] .

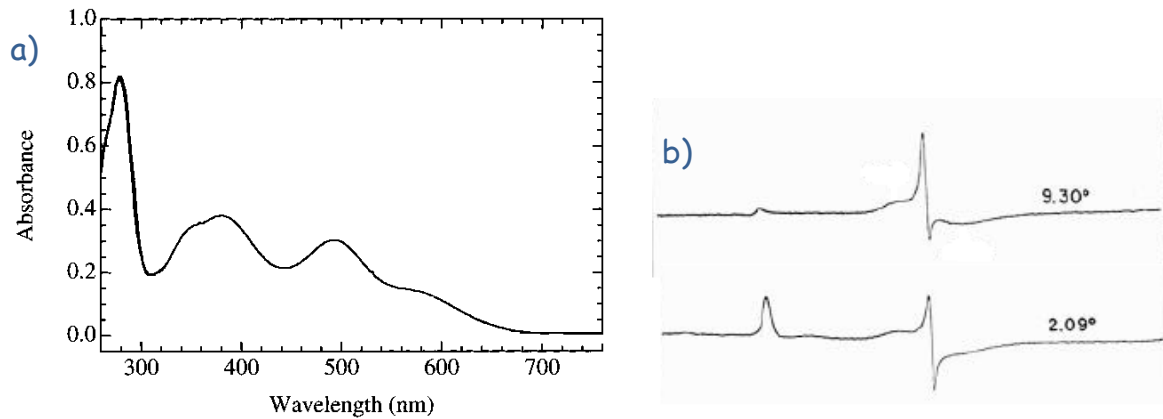


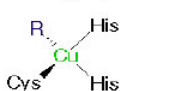

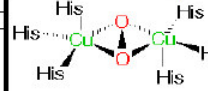
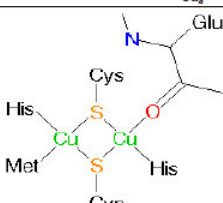
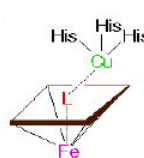

Figure 38 : a) Spectre d'absorbance UV-visible d'une rubrédoxine [185]. b) Spectres RPE à 2,09 et 9,3 °K d'une rubrédoxine [186].

Les protéines à cuivre

Le cuivre est également un atome possédant des propriétés redox exploitées par les protéines pour faire du transfert électronique. Ces protéines sont divisées en plusieurs catégories définies dans le Tableau 3.

Parmi les protéines à cuivres de type I, les plus courantes sont les azurines, les plastocyanines, les pseudoazurines et les amicyanines [76, 188].

Tableau 3 : Définition des cinq types de protéines à cuivre et structure d'une Azurine (pdb 1dyz).

Type I (protéines à cuivre bleues)	Type II	Type III
 R = S _{met} (azurin, plastocyanin, laccase) R = O _{glu} (phytoeyanins) R = H ₂ O (ceruloplasmin)	 L = N, O ou S	 Catechol oxidase Tyrosinase Haemocyanins
Blue oxidases Ascorbate oxidase Ceruloplasmin Laccase Nitrite reductase	Dioxygenases Monooxygenases Dopamine β-hydroxylase Methane monooxygenase Peptidylglycine -hydroxylating monooxygenase Phenylalanine hydroxylase Nitrite reductase Non-blue oxidases Amine oxidase Diamine oxidase Galactose oxidase Lysyl oxidase	
Cu₂  Cytochrome c oxidase N-O reductase	Cu₂  Cytochrome c oxidase Ubiquinone oxidase	

Les autres métalloprotéines

D'autres métaux sont parfois impliqués dans les protéines comme le nickel, le molybdène, le ruthénium [189], le vanadium [190]. Ces métaux jouissent d'une structure de bande particulière qui leur donne des caractéristiques enzymatiques particulières [191, 192].

Partie 1 : Fabrication du nanofil

La première partie de mon travail de thèse consiste à fabriquer le nanofil conducteur, c'est-à-dire à réaliser une protéine chimère qui va pouvoir s'assembler en fibre amyloïde avec une rubrédoxine fonctionnelle le long de celle-ci. Cela commence par la production des protéines, du clonage jusqu'à la purification. Ensuite, il faut s'assurer que la réalisation d'un lien physique entre les deux protéines n'altère pas leur fonction. Dans notre cas, il faut s'assurer que : i) la présence de la rubrédoxine n'altère pas la formation des fibres amyloïdes, ii) la présence de la fibre amyloïde n'altère pas la capacité de transfert d'électrons de la rubrédoxine. Pour ces différents points, les caractéristiques de la protéine chimère ont été comparées à celles des protéines d'origine afin de s'assurer qu'il n'y a pas eu de modification rédhibitoire pour que la protéine soit fonctionnelle.

1 Matériels et méthodes

1.1 La production de protéines recombinantes

La production de protéines recombinantes est régulièrement utilisée pour mener des recherches en biochimie [150, 155, 179]. Dans l'industrie, elle est utilisée depuis les années 80 pour la production d'insuline [193]. Elle s'étend de plus en plus en thérapeutique avec, par exemple, la production d'immunoglobulines. Le développement de ce type de production est d'ailleurs indispensable à une production industrielle rentable d'objets technologiques comme nous le proposons.

1.1.1 Le principe

La production de protéines est un phénomène complexe réalisé à chaque instant par les êtres vivants. Plutôt que de tenter de reproduire ce mécanisme in vitro comme cela est fait avec succès pour la production d'ADN, la protéine est produite par un organisme vivant.

Pour cela, le gène codant pour la protéine est introduit dans un organisme hôte qui va la produire. Ce gène doit être préalablement introduit dans un vecteur (à adapter à l'organisme hôte) qui va permettre son intégration et l'initiation de la transcription. Les organismes hôtes simples tels que les bactéries permettent une meilleure production mais ne permettent pas de faire les

modifications post-traductionnelles. La bactérie convient à la production de notre protéine qui ne nécessite pas de modification post-traductionnelle.

Le vecteur adapté est un brin d'ADN circulaire appelé plasmide dans lequel la séquence ADN codant pour notre protéine est insérée. Ce plasmide est introduit dans une bactérie et se multiplie avec celle-ci. La transcription et la traduction de la protéine sont ensuite déclenchées. Les protéines ainsi produites sont ensuite extraites des bactéries et isolées dans un processus de purification (Figure 39).

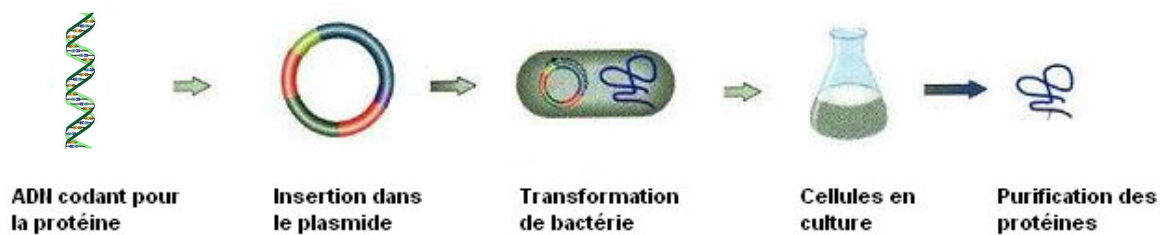


Figure 39 : Schéma des étapes de production d'une protéine recombinante

1.1.2 Le domaine prion Het-s 218-289

Le plasmide

Seul le domaine formant des fibres amyloïdes de la protéine het-s nous intéresse (résidus 218 à 289). Le gène codant pour ce domaine a été extrait du génome de *podospora anserina* et inséré dans le plasmide pet24a par une équipe étudiant cette protéine [153]. Nous avons pu obtenir ce plasmide ainsi que sa cartographie. Ce plasmide possède un gène de résistance à la kanamycine et un opéron lac qui permet une induction à l'isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG). Il dispose également d'une séquence comprenant plusieurs sites de restriction permettant l'insertion de la séquence d'intérêt (voir annexe 2.1).

La séquence codant pour het-s 218-289 suivie d'une séquence codant pour 6 histidines (servant lors de la purification) a été introduite entre les sites de restriction NdeI et HindIII (Figure 40).

```

      1      10
      M K I D A I V G R N S A K D I R T
(CAT) ATGAAGATCG ACGCGATTGT GGGAAGGAAT TCCGCCAAGG ATATCAGAAC

      20      30
      E E R A R V Q L G N V V T A A A L
AGAGGAACGT GCAAGGGTCC AGCTCGGCAA TGTGTCTACT GCGGCAGCCC

      40      50
      H G G I R I S D Q T T N S V E T
TACATGGTGG GATCCGTATC AGCGACCAGA CAACCAACTC GGTAGAGACG

      60
      V V G K G E S R V L I G N E Y G G
GTTGTGGGGA AGGGCGAGTC TAGGGTCCTT ATTGGAAATG AGTACGGAGG

      70
      K G F W D N H H H H H H *
TAAGGGGTTC TGGGATAATC ACCATCACCAT CATCACTAA (GCTT)

```

Figure 40 : Séquences ADN et peptidique de het-s 218-289. Les bases du plasmide précédant et suivant cette séquence sont entre parenthèses. Les sites de restriction NdeI et HindIII sont en gras et en italique.

La transformation du plasmide dans *Escherichia Coli*

La transformation consiste à faire entrer le plasmide dans la bactérie. Cela est réalisé par choc thermique sur des *E. Coli* BL21(DE3) PlysS compétentes (protocole en annexe 2.2). BL21(DE3) est une souche communément utilisée pour produire des protéines recombinantes. Le fait qu'elles soient "PlysS" signifie que les bactéries disposent d'un plasmide de plus produisant du lysozyme. Celui-ci permet de fragiliser la paroi des cellules, ce qui est utile lors de l'extraction finale des protéines. Leur utilisation requiert l'ajout de l'antibiotique chloramphénicol.

Des bactéries sont dites compétentes lorsqu'elles ont la capacité d'introduire un plasmide dans leur cytoplasme. Elles acquièrent généralement cette propriété après avoir subi un traitement visant à fragiliser leur membrane.

La culture des bactéries

La culture est effectuée en milieu LB. Une pré-culture est réalisée sur un petit volume afin d'amorcer la reproduction des bactéries. Cette pré-culture sert ensuite de source initiale pour amorcer la culture. Celle-ci est réalisée à 37°C et sous agitation jusqu'à obtenir une absorbance à 600 nm de 0,7. L'IPTG est alors introduit et déclenche l'expression des protéines pendant 4h. Les bactéries sont ensuite collectées par centrifugation et stockées à -80°C.

La purification de het-s 218-289 his6

La protéine het-s 218-289 est accumulée dans les bactéries sous la forme de corps d'inclusion qui sont des agrégats insolubles. La purification des protéines commence donc par un isolement,

puis une solubilisation de ces corps d'inclusion. Cela est réalisé à forte concentration d'urée ou de guanidine.

Ensuite, la purification est effectuée par une étape de chromatographie d'affinité sur métal immobilisé (IMAC). Ce type de chromatographie met en jeu une série de six histidines ajoutées à l'une des extrémités de la protéine [194]. Ce "tag" vient se complexer à un atome de Nickel ou de Cobalt présent sur la colonne de chromatographie. Ainsi, seule la protéine d'intérêt est retenue sur la colonne et peut donc être séparée des autres. La protéine est finalement décrochée par l'imidazole (IMDZ), molécule compétitrice des histidines (protocole complet en annexe 2.3). Une fois isolée, la protéine est stockée dans un milieu acide acétique 1% pH 2,7 à -20°C qui permet un meilleur stockage. Cela permet aussi de déclencher la formation de fibres à la demande par simple ajustement du pH.

La pureté des protéines est estimée par SDS-PAGE 15 %. La quantification est effectuée à l'aide de l'absorbance à 280 nm. Le coefficient d'extinction théorique est $\epsilon = 7000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

1.1.3 La rubrédoxine de *methanococcus voltae*

Le choix

La base de données UniProtKB a été utilisée pour choisir la rubrédoxine selon deux critères : la taille et le potentiel isoélectrique (pI).

Il est important d'avoir une petite protéine pour limiter les contraintes stériques. Nous avons déjà vu que certaines des rubrédoxines disposent d'une boucle en moins et contiennent autour de 45 résidus. Parmi celles-ci, la rubrédoxine de *methanococcus voltae* se démarque en raison de son potentiel isoélectrique de 7,23 alors que les rubrédoxines sont généralement des protéines acides avec un pI de 4 à 5. Le fait d'avoir un pI proche de 7 permet de limiter les répulsions électrostatiques entre protéines à pH physiologique car leur charge est globalement neutre.

Voici la séquence de cette protéine dans laquelle les acides aminés chargés positivement sont en rouge, ceux chargés négativement en bleu, les hydrophobes sont en vert et les cystéines en jaunes.

1 10 20 30 40
MAIWQCTVC GYKYDEDEK KKFEDLPADC KCPVCGAKKE MFKKL

Il y a cinq résidus cystéine alors que seulement quatre sont nécessaires pour lier le métal. Il est possible que cette cystéine dépariée soit à l'origine d'une instabilité du centre fer si celle-ci

cherche à se lier au métal. Un alignement de séquences avec d'autres rubrédoxines montre que la cystéine 29 n'est pas conservée. Ce résidu est généralement une tyrosine ou un tryptophane. La cystéine 29 sera donc mutée en tyrosine.

La construction du plasmide

La séquence ADN codant pour la rubrédoxine de *methanococcus voltae* a été commandée en tant que gène de synthèse auprès de Cogenics. La séquence a été modifiée par rapport à la séquence originale de manière à employer les codons fréquemment utilisés par E. Coli. De cette manière, la transcription sera plus efficace. La mutation de la cystéine 29 en tyrosine est également effectuée (Figure 41). Cette séquence est livrée dans un plasmide qui n'est pas un plasmide d'expression.

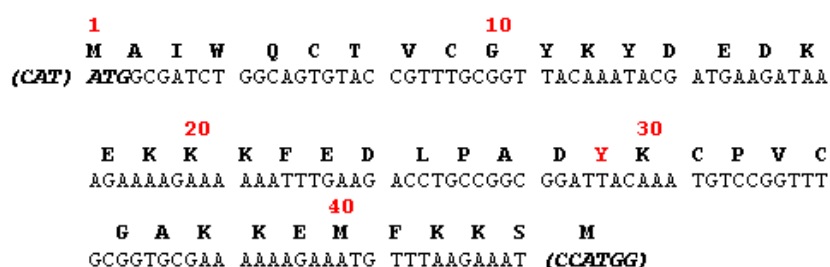


Figure 41 : Séquence ADN et peptidique de la rubrédoxine de *methanococcus voltae*. Elle est insérée entre les sites de restriction NdeI et NcoI (gras italique). Les bases précédant et suivant cette séquence sont entre parenthèses.

Cette séquence est amplifiée par PCR avec les primers suivants :

5' GCCCTTTAACATATGGCGATCTGGCAGTG3'

5' GGATAAAGCTTAGTGATGATGGTGATGATGCATTTTCTTAAACATTTCTT 3'

Le second primer permet d'introduire à la suite de la séquence originale :

- les 6 histidines en fin de séquence pour la purification sur IMAC
- le codon stop
- le site de restriction HindIII pour faire le clonage dans le nouveau plasmide

Le plasmide choisi pour exprimer la protéine est le pt7-7. Il possède un gène de résistance à l'ampicilline et la transcription est induite par l'IPTG. La zone de liaison des inserts comprend les sites de restriction NdeI et HindIII.

La séquence finale du clonage est montrée dans la Figure 42 :

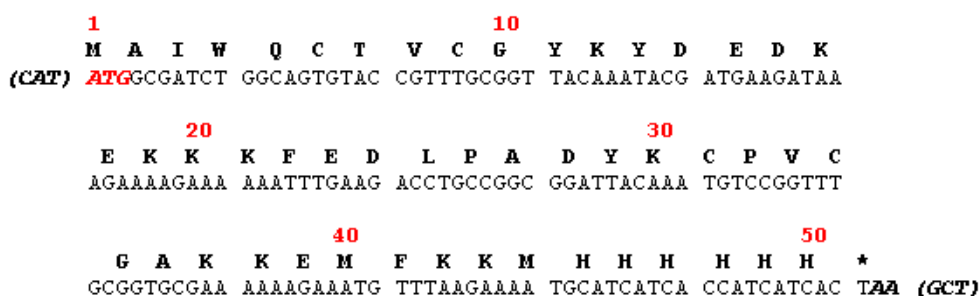


Figure 42 : Séquences ADN et peptidique du clone réalisé pour la rubrédoxine de *methanococcus voltae*.

La production des protéines dans *Escherichia Coli*

La culture des métalloprotéines est particulière. En effet, lors de la production d'une protéine recombinante ayant un cofacteur métallique, il arrive qu'un autre métal vienne prendre la place du cofacteur. Cette substitution de métal peut être évitée en effectuant la culture dans un milieu M9 (aussi appelé milieu minimum) supplémenté en fer [195].

La multiplication des bactéries est enclenchée dans une pré-culture en milieu LB, puis dans une deuxième pré-culture en milieu M9, avant d'effectuer la culture en milieu M9 supplémenté en fer. L'expression des protéines est induite à l'IPTG pendant 4h. Les bactéries sont collectées par centrifugation et stockées à -80°C.

La purification des protéines recombinantes

A l'inverse de Het-s 218-289, la rubrédoxine ne forme pas de corps d'inclusion et se retrouve donc en solution après la lyse des cellules. De plus, elle est acidophile, ce qui permet de faire précipiter une grande partie des protéines d'*E. Coli* sans altérer la protéine d'intérêt. Une étape de chromatographie IMAC permet d'achever la purification (protocole complet en annexe 2.3). Les protéines sont finalement stockées dans un tampon tris à pH 8 à -20 °C.

La pureté des protéines est estimée par SDS-PAGE 15 % et par le ratio DO_{280}/DO_{490} . La protéine possède différentes bandes d'absorbance caractéristiques dont une à 490 nm pour un coefficient d'extinction de $6600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. L'absorbance à 280 nm venant des résidus aromatiques possédant un coefficient d'extinction de $10000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, le ratio DO_{280}/DO_{490} est théoriquement de 1,51. Cela permet également de faire la quantification de la protéine.

1.1.4 La protéine chimère : Rd-het

La réalisation du plasmide

La réalisation d'une protéine chimère se fait par l'insertion successive des deux séquences d'intérêt dans le même plasmide. La rubrédoxine est insérée côté N-terminal dans la séquence, ce qui vise à respecter le fonctionnement naturel de het-s¹⁰.

Dans un premier temps, la séquence de het-s est extraite du plasmide pet 24a par PCR¹¹ en utilisant les primers suivants :

5' GGAGATATAC **CCATGG**AGATCGACGCG 3'

5' CGATCGGCCGCAAGCTTAGTGATGATGGTGATGG 3'

Ces primers permettent de remplacer le site de restriction NdeI en début de séquence par un site NcoI. Cette séquence est insérée dans le plasmide pt7-7 entre les sites de restriction NcoI et HindIII.

Deuxièmement, la séquence de la rubrédoxine de *methanococcus voltae* (Figure 41) est extraite de son plasmide d'origine par digestion et excision de la bande correspondante sur gel d'agarose. Elle est ensuite insérée entre les sites NdeI et NcoI du plasmide pt7-7 précédemment modifié. La séquence finale est présentée dans la Figure 43.

Cette protéine chimère comprend la séquence de la rubrédoxine entre les résidus 1 et 44, la séquence de het-s 218-289 entre les résidus 46 et 117, et une queue histidine entre les résidus 118 et 123. Le premier résidu de het-s 218-289 est muté. Cette mutation d'une lysine (K) en acide glutamique (E) est liée à l'insertion du site de restriction NcoI nécessaire au clonage. Etant donné que cet acide aminé se trouve à une extrémité du domaine, l'impact de cette mutation devrait être nul.

¹⁰ Dans la protéine naturelle, het-s possède un domaine de reconnaissance situé côté Nter qui utilise la fibre amyloïde comme support. En mimant ce fonctionnement, il y a plus de chances d'obtenir une protéine chimère avec deux domaines fonctionnels.

¹¹ Polymerase Chain Reaction : Manipulation qui consiste à multiplier une séquence ADN d'intérêt. Cette séquence est ciblée à l'aide de petits morceaux d'ADN appelés primers.

```

1           10
M A I W Q C T V C G Y K Y D E D K
(CAT) ATGCGCATCT GGCAGTGTAC CGTTTGCGGT TACAAATACG ATGAAGATAA

20           30
E K K K F E D L P A D Y K C P V C
AGAAAAGAAA AAATTTGAAAG ACCTGCCGGC GGATTACAAA TGTCCGGTTT

40           50
G A K K E M F K K S M E I D A I
GCGGTGCGAA AAAAGAAATG TTAAAGAAAT CCATGGAGAT CGACGCGATT

60
V G R N S A K D I R T E E R A R V
GTGGGAAGGA ATTCCGCCAA GGATATCAGA ACAGAGGAAC GTGCAAGGGT

70           80
Q L G N V V T A A A L H G G I R I
CCAGCTCGGC AATGTTGTCA CTGCGGCAGC CCTACATGGT GGGATCCGTA

90           100
S D Q T T N S V E T V V G K G E
TCAGCGACCA GACAACCAAC TCGGTAGAGA CGGTTGTGGG GAAGGGCGAG

110
S R V L I G N E Y G G K G F W D N
TCTAGGGTCC TTATTGGAAG TGAGTACGGA GGTAAGGGGT TCTGGGATAA

120
H H H H H H *
TCACCATCAC CATCATCACT AA (GCTT)

```

Figure 43 : Séquence ADN et peptidique de la protéine chimère Rd-het. Les sites de restriction NdeI, NcoI et HindIII sont en gras italique. Les bases précédant et suivant la séquence sont entre parenthèse.

La production des protéines dans Escherichia Coli

La production des protéines se fait de la même manière que pour la rubrédoxine.

La purification des protéines recombinantes

La purification de la protéine chimère est différente de celle des protéines isolées car elle est impactée par les caractéristiques des deux domaines. Comme la rubrédoxine, elle ne forme pas de corps d'inclusion. Par contre, elle possède la capacité de former des fibres amyloïdes très vite comme le domaine de Het-s. Purifier une protéine sous sa forme soluble est préférable car cela permet de conserver la rubrédoxine intègre et de s'affranchir de la reconstitution du centre fer. Il est donc indispensable d'empêcher la formation des fibres amyloïdes en dénaturant ce domaine dès la lyse des bactéries.

Le protocole de purification commence par une lyse des bactéries dans un milieu dénaturant qui est l'urée 8 M. Bien que cela soit peu conventionnel, cela permet d'inhiber au plus tôt la

formation des fibres amyloïdes, et ainsi de préserver de l'agrégation les protéines exprimées. La lyse est réalisée par ultrasons. Elle est suivie d'une centrifugation et d'une étape de chromatographie IMAC. Une dialyse en fin de purification permet de passer en acide acétique (protocole détaillé en annexe 2.3).

L'acide acétique permet un meilleur stockage des protéines et permet également de contrôler la formation des fibres par ajustement du pH. La pureté des protéines est estimée par SDS-PAGE 15 % et par le ratio DO_{280}/DO_{490} . La protéine possède les différentes bandes d'absorbance caractéristiques de la rubrédoxine dont une à 490 nm pour un coefficient d'extinction de $6600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. L'absorbance à 280 nm due aux résidus aromatiques possède un coefficient d'extinction de $17000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, ce qui correspond à la somme des coefficients d'extinction du domaine de het-s (7000) et de la rubrédoxine (10000). Le ratio DO_{280}/DO_{490} attendu pour la protéine chimère est donc 2,57. Cela permet également de faire la quantification de la protéine.

1.2 La caractérisation des fibres amyloïdes

La caractérisation des fibres amyloïdes est essentielle pour s'assurer que celles-ci se forment bien. Dans le cas contraire, il n'est pas possible de réaliser un nanofil. Les fibres amyloïdes ayant été énormément étudiées, de nombreuses techniques existent pour les caractériser (voir introduction p26). Ces techniques sont complémentaires et donnent accès à différentes informations. Cependant, elles ne sont pas toutes facilement accessibles. Cette partie va présenter celles qui ont été utilisées au cours de mes travaux de thèse.

1.2.1 La formation des fibres

Avant de caractériser les fibres amyloïdes, celles-ci doivent être formées. Les protéines sont stockées dans de l'acide acétique à pH 2,7 qui empêche la formation des fibres. La formation des fibres amyloïdes peut être déclenchée par un simple rehaussement du pH au-dessus de 3. Plusieurs méthodes permettent d'effectuer cette opération.

Ajout de solution basique

Afin d'augmenter le pH d'une solution, le plus simple est d'ajouter une petite quantité de solution fortement basique telle que du tris basique concentré ou de la soude. L'avantage de cette technique est qu'elle modifie très peu le volume initial. Cependant, il n'y a pas d'effet tampon à un pH maîtrisé. Celui-ci est juste ajusté. De plus, l'ajout d'une solution fortement basique crée un fort gradient de pH de manière locale, ce qui est un traitement agressif pour les protéines.

Dilution rapide dans une solution tamponnée

Le pH d'une solution acide peut être augmenté en diluant cette solution dans une solution tamponnée à un pH plus élevé. Dans le cas de nos protéines stockées en acide acétique 170 mM, une dilution d'un facteur 100 dans un tampon à 100 mM permet d'annihiler complètement l'effet des molécules acides. La contrainte de cette technique est qu'il est nécessaire d'avoir une protéine suffisamment concentrée au départ pour avoir une concentration acceptable dans la solution finale. Or, il n'est pas aisé de concentrer nos protéines.

Dialyse

La dialyse est un moyen efficace de changer le tampon des protéines. Il est même possible de ne mettre aucun tampon. Cela présente l'avantage de ne pas avoir de cristaux lorsque l'échantillon est séché sur un substrat. Dans ce cas, le pH final de l'échantillon est autour de 6 pour la protéine chimère. Il semble que cette protéine possède un fort pouvoir tampon dans cette zone.

Les inconvénients de cette technique sont le temps (une nuit) et l'incapacité de suivre une cinétique. De plus cette technique entraîne des variations sur la concentration de l'échantillon à cause de la perte d'une partie de l'échantillon (protéines agrégées sur la membrane et/ou pertes lors de la récupération de l'échantillon) et de sa dilution. Etant donné qu'il n'est pas possible de doser les protéines dans un échantillon de fibres amyloïdes (problème de diffusion perturbant le spectre d'absorbance), la concentration des échantillons ne peut être qu'estimée avec une mauvaise précision (estimée à 15%). Cet aspect peut avoir des répercussions sur certaines expériences.

1.2.2 La fluorescence de la thioflavine

La thioflavine est un fluorophore qui se fixe sur les fibres amyloïdes. Lorsque cela se produit, ses caractéristiques de fluorescence sont modifiées. Le maximum d'excitation est décalé de 385 à 450 nm. Le maximum d'émission est décalé de 445 à 482 nm. Enfin, l'intensité de fluorescence augmente fortement. Le mode de fixation de la thioflavine aux fibres amyloïdes, et les mécanismes à l'origine des modifications de ses caractéristiques de fluorescence ne sont pas encore bien connus. Il semble cependant qu'une fixation de l'angle entre les deux cycles aromatiques de la molécule (Figure 44 a) soit à l'origine d'une meilleure absorption et émission des photons. La chiralité des fibres amyloïdes semble jouer un rôle dans la fixation de cet angle [196-198].

Il est donc possible de sonder la présence de fibres amyloïdes en mesurant la fluorescence de la thioflavine pour une excitation à 450 nm. Cela est réalisé à l'aide d'un spectrofluorimètre jasco FP6500. Les paramètres sont une excitation à 450 nm (largeur de bande de 5 nm) et une émission mesurée de 460 à 540 nm (largeur de bande 10 nm). Trois spectres sont enregistrés pour augmenter le rapport signal sur bruit.

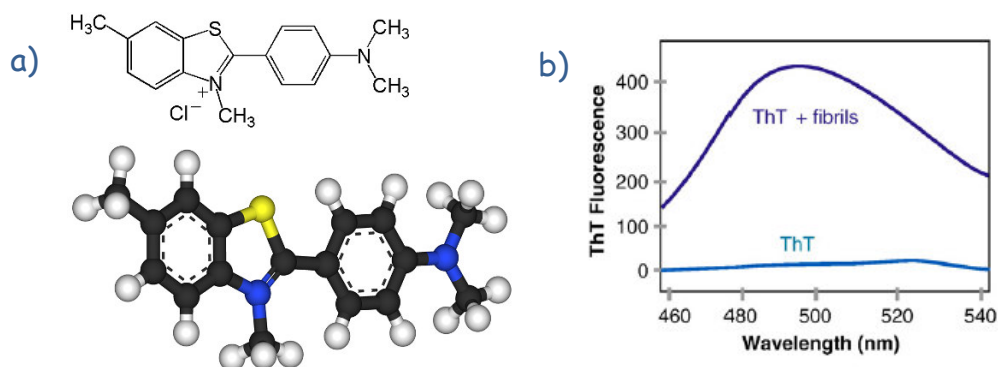


Figure 44 : a) Représentations de la molécule de thioflavine. b) Exemples de spectre de fluorescence de la thioflavine en présence et absence de fibres amyloïdes.

La spectroscopie de fluorescence est utilisée en comparatif : avec ou sans protéine, avec ou sans thioflavine, avant ou après changement de pH. Dans les expériences réalisées dans cette thèse, cette technique va mettre en évidence la formation de fibres amyloïdes après avoir effectué un saut de pH. Celui-ci est effectué par ajout d'une faible quantité de tris basique concentré (pH 11) à l'échantillon comme cela est décrit dans la littérature [153]. La thioflavine est utilisée en concentration équimolaire avec la protéine. Cette règle empirique ne constitue pas forcément un optimal mais permet tout de même une bonne dynamique d'observation.

1.2.3 La diffusion de lumière

La formation des fibres amyloïdes est une polymérisation. Cela signifie un grossissement des espèces en solution qui peut être observé par diffusion de lumière [199, 200]. Une mesure simple de diffusion de lumière peut être faite à l'aide du spectrofluorimètre jasco FP6500 car celui-ci détecte la lumière à 90° par rapport à l'excitation (Figure 45). La longueur d'onde est fixée dans une zone où il n'y a pas de molécule absorbante et la détection se fait à la même longueur d'onde. La mesure de ce signal au cours du temps permet d'observer la cinétique de formation des fibres amyloïdes. La diffusion est initialement mesurée sur un tampon à pH8 (tris 0,1 M NaCl 0,1 M). L'échantillon de protéine stocké en acide acétique est ensuite dilué dans ce tampon, ce qui déclenche la formation des fibres amyloïdes.

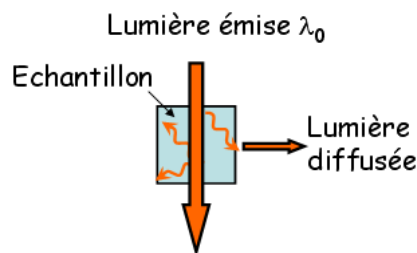


Figure 45 : Schéma de principe de la diffusion de lumière.

Bien que cette technique puisse être utilisée pour réaliser des cinétiques de formation de fibres, elle présente des limites. Le fait que l'angle de mesure soit fixe à 90° ne permet pas d'obtenir différentes informations comme cela se fait avec un appareil spécifique de diffusion de lumière dynamique. De plus, la diffusion de lumière est plus importante pour les gros objets que pour les petits, ce qui est limitant pour l'étude d'échantillons hétérogènes. Dans le cas de la formation des fibres amyloïdes, la formation rapide de quelques agrégats de fibres peut masquer la cinétique de formation de la majorité de l'échantillon.

1.2.4 La microscopie électronique en transmission

La microscopie électronique en transmission (TEM) permet d'obtenir des informations sur la morphologie des fibres amyloïdes. La technique de coloration négative consiste en la réalisation d'un moule avec des sels de métaux lourds. Les protéines sont adsorbées sur un film de carbone, qui est ensuite plongé dans un sel d'uranyle. Un ménisque de liquide contenant le métal se crée autour des protéines, réalisant ainsi un moule opaque au passage des électrons (Figure 46). Le film de carbone est récupéré sur une grille de cuivre permettant sa manipulation et son soutien dans le microscope.

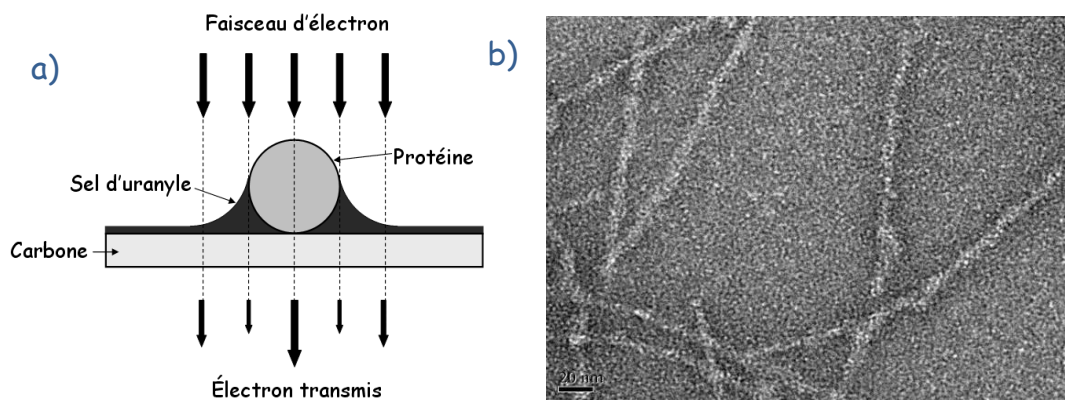


Figure 46 : a) Principe de la technique de coloration négative de microscopie électronique en transmission.
b) Exemple d'image de fibre amyloïde réalisée.

Dans les travaux présentés dans cette thèse, cette technique a servi à vérifier la formation des fibres amyloïdes et également à étudier l'impact du pH sur la morphologie des fibres.

1.2.5 La microscopie à force atomique

Le microscope à force atomique (AFM) est un outil développé pour faire du relevé de topologie à l'échelle du nanomètre. Le principe repose sur une pointe très fine (appelée cantilever) qui vient sonder la surface de l'échantillon et dont le mouvement est détecté par un laser se réfléchissant à son dos.

Il existe deux modes principaux pour l'AFM : le mode "tapping" et le mode "contact". Dans ce deuxième mode, un contact permanent est présent entre la surface et la pointe durant le balayage. Lorsque la pointe rencontre un changement d'altitude, le laser se réfléchissant sur elle change de direction. Ce changement est détecté par une photodiode (Figure 47). Le principe de fonctionnement est le même en mode tapping, sauf que le contact pointe/surface n'est pas permanent car la pointe effectue des oscillations. Ce mode détériore moins l'échantillon car il n'y a pas l'effet de "labourage" de la surface. Il permet en plus d'obtenir d'autres informations par l'intermédiaire des paramètres du signal sinusoïdal. Les variations de phase ou d'amplitude sont des éléments révélateurs d'un matériau différent et non pas juste d'une topologie différente.

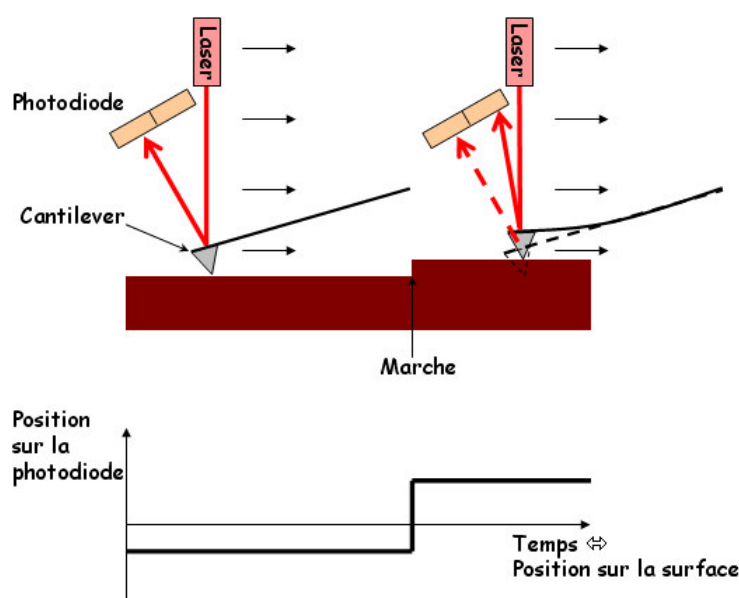


Figure 47 : Principe de fonctionnement de l'AFM.

La résolution accessible avec l'AFM est de l'ordre du nanomètre pour la hauteur (axe z). Pour les déplacements dans le plan (axes x et y), elle est liée au rayon de courbure de la pointe, qui dépend de son usure. De manière générale, la résolution est suffisante si la courbure de la pointe est inférieure à la dimension des objets observés (Figure 48).

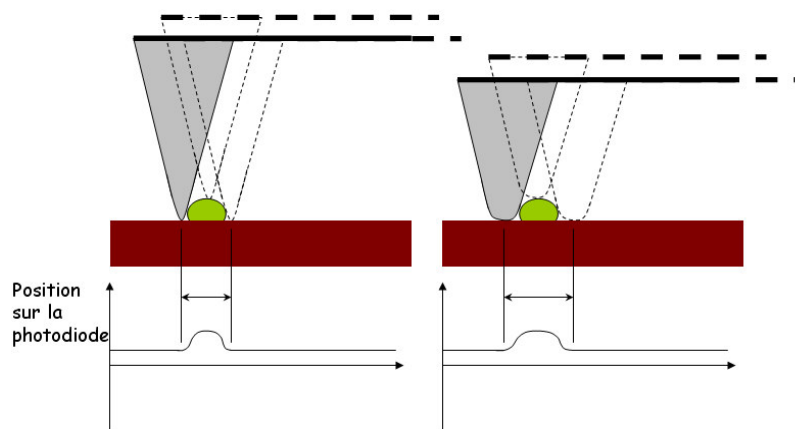


Figure 48 : Usure de la pointe. A gauche, une pointe peu usée donne des dimensions réalistes. A droite, une pointe usée grossit les objets.

D'autres manières d'utiliser l'AFM naissent régulièrement car l'outil est efficace à cette échelle. Les principaux développements visent à étudier les caractéristiques mécaniques ou électriques du matériau. Dans le premier cas, l'interaction de la pointe avec la surface est analysée en détail. Dans le deuxième, une pointe recouverte de métal permet d'appliquer un potentiel. Le courant traversant la pointe permet d'effectuer un relevé des zones conductrices d'une surface en même temps que le relevé topologique.

En ce qui concerne les fibres amyloïdes, l'AFM a été utilisé dans ce projet pour effectuer de l'imagerie des protéines séchées sur un substrat. Cela permet de contrôler la présence et la position de fibres amyloïdes sur la surface. L'utilisation de l'AFM conducteur est une option pour mesurer un courant à travers les fibres. Ce travail sera présenté dans la deuxième partie de cette thèse.

1.3 La caractérisation de la rubrédoxine

Afin de réaliser un nanofil conducteur d'électricité, il faut que la rubrédoxine soit capable d'échanger des électrons. Cela implique que son cofacteur métallique soit présent, qu'il soit bien coordonné, et qu'il soit dans le bon état redox. Enfin, il faut que cet état redox puisse changer pour échanger des électrons. Ces différents points sont vérifiés par différentes techniques.

1.3.1 La spectroscopie d'absorbance UV-visible

Les liaisons de coordination entre un atome métallique et ses ligands dans une protéine donnent des bandes caractéristiques sur un spectre d'absorbance UV-Visible. Les bandes attendues dans le cas de la rubrédoxine sont répertoriées dans le Tableau 4 avec les coefficients d'extinction correspondants. L'état oxydé FeIII présente une couleur rouge vif en raison d'une forte absorbance de 300 à 600 nm. L'état réduit FeII est lui incolore en raison d'une absorbance située dans l'UV proche. La rubrédoxine possède un cœur d'aromatiques entraînant une bande d'absorbance à 280 nm qui n'est pas dépendante de l'état d'oxydation.

Tableau 4 : Caractéristiques des différentes raies d'absorbance de la rubrédoxine de *methanococcus voltae*.

	longueur d'onde (nm)	coefficient d'extinction ($M^{-1}.cm^{-1}$)
Fe III	350	7000
	380	7700
	490	6600
	570	3200
	750	350
Aromatiques	280	10000
Fe II	310	4500
	331	4500

Le spectre UV-visible permet donc de vérifier la présence d'un ligand métallique et d'attester que celui-ci est lié aux bons ligands.

1.3.2 La résonance paramagnétique électronique

Le principe physique

La résonance paramagnétique électronique (RPE) donne des renseignements sur l'environnement électronique de l'atome de Fer. Cet environnement est un élément clé pour s'assurer que le métal est dans le bon état pour échanger ses électrons.

La RPE utilise l'effet Zeeman qui consiste en la séparation des niveaux d'énergie de différents électrons sous l'effet d'un champ magnétique (Figure 49). Les électrons peuvent effectuer des

transitions entre les niveaux d'énergie séparés que l'on appelle doublet de Kramer. Ces transitions sont couplées à l'absorption et à l'émission de photons qui peuvent être détectés. Dans le cas d'un électron libre, l'énergie nécessaire à la transition est définie par l'équation : $\Delta E = g_e \mu_B B_0$ où g_e est le facteur g de l'électron libre, μ_B le magnéton de Bohr et B_0 le champ magnétique appliqué. Dans le cas d'un électron en interaction, le facteur g correspondant est différent de g_e et est caractéristique de l'environnement électronique de l'électron.

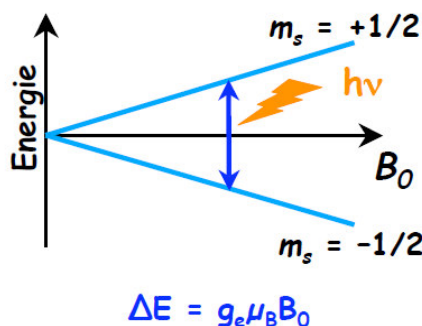


Figure 49: Principe de l'effet Zeeman pour un électron libre.

Pour qu'un atome ou une molécule ait une réponse en RPE, il est nécessaire d'avoir un ou plusieurs électron(s) non-apparié(s). En effet, les moments magnétiques de deux électrons appariés sont inverses et se compensent. Cela implique, que les molécules organiques comme les protéines n'ont pas de réponse en RPE. Les ligands métalliques doivent avoir un moment de spin demi-entier. Ainsi, le fer III est détectable mais pas le fer II. Un centre avec deux atomes de fer III en interaction n'est pas non plus détectable.

Dans le cas de systèmes de spin complexes tels qu'il en existe pour les ligands métalliques dans les protéines, différentes transitions sont possibles entre différents niveaux d'énergie. Ces transitions dépendent de l'environnement électronique de l'atome et sont caractérisées par leur facteur g qui est alors nommé g_{eff} . D'un point de vue biophysique, les différents g_{eff} constituent des signatures caractéristiques permettant d'affirmer que le métal est dans la bonne configuration pour effectuer du transfert d'électrons.

L'application expérimentale

Des protéines en solution sont mises dans un tube adapté et l'ensemble est congelé. De cette manière, le spectre observé est dit de "poudre", car toutes les orientations y sont présentes et sont figées. La mesure est réalisée à l'aide d'un spectromètre Bruker. La longueur d'onde

d'excitation est fixe (environ 9 GHz) et le champ magnétique varie grâce à un électro-aimant. C'est généralement la dérivée de l'absorbance en fonction du champ magnétique qui est représentée et qui permet de remonter au g_{eff} (Figure 50).

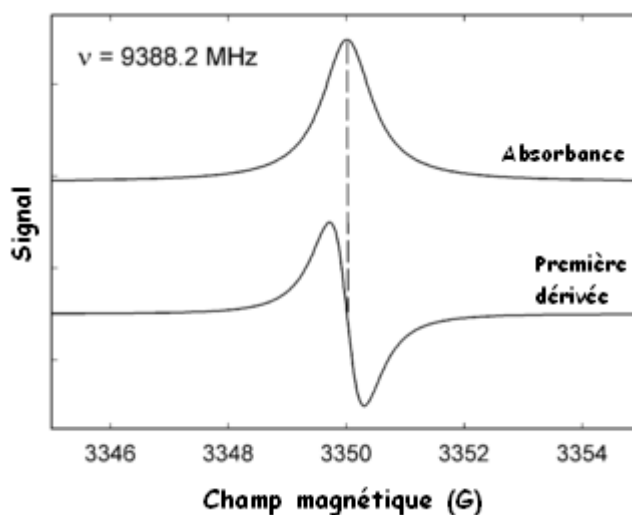


Figure 50 : Spectre RPE et sa dérivée simulés pour un électron libre.

1.3.3 La titration redox

La titration redox

Selon l'équation Eq 2 de la page 43, la proportion de protéine oxydée suit une loi sigmoïdale en fonction du potentiel de la solution. La titration redox consiste en la vérification de cette loi. Cela atteste de la capacité des rubrédoxines à changer d'état redox, c'est à dire à échanger leur électron. C'est une caractérisation directe de la fonction de transfert. L'évolution de l'état redox de la protéine est suivie pendant que le potentiel environnant est modifié. Le suivi est effectué par spectroscopie d'absorbance, étant donné que les bandes d'absorption de la protéine changent avec le degré d'oxydation du fer.

Montage expérimental

L'ensemble de l'expérimentation est réalisé en boîte à gants afin que l'oxygène de l'air ambiant ne vienne pas perturber le potentiel. Ce dernier est modifié par ajouts successifs de molécules réductrices (dithionite de sodium) jusqu'à réduction totale de l'échantillon ; puis de molécules oxydantes (Potassium hexachloroiridate) jusqu'à un retour à l'état initial. Le potentiel est contrôlé avec une électrode de platine et une électrode de référence Ag/AgCl qui plongent

directement dans la cuve en quartz contenant l'échantillon. Des fibres optiques reliées à un spectrophotomètre permettent d'effectuer les mesures d'absorbance. L'échantillon est agité.

Les médiateurs

Des petites molécules appelées médiateurs sont également introduites dans la solution. Leur rôle est de faciliter les échanges d'électrons de la protéine avec l'électrode afin d'obtenir plus rapidement l'équilibre. Plusieurs médiateurs sont nécessaires afin que pour chaque potentiel de la gamme étudiée, au moins un médiateur existe à la fois sous sa forme oxydée et sa forme réduite. Il est également important que les médiateurs ne viennent pas perturber la mesure optique. Les médiateurs utilisés sont répertoriés dans le Tableau 5.

Tableau 5 : Liste des médiateurs et caractéristiques

Médiateur	Potentiel redox (mV)	λ absorbance (nm)
Safranine T	-290	520
Indigo Carmin	-130	610
Resorufine	-55	570
Thionine	60	597

Le traitement des données

Pour chaque potentiel, l'absorbance à 490 nm est relevée et normalisée par rapport à la valeur initiale (correspondant à 100% de protéine oxydée). A l'aide du logiciel Sigma plot, l'équation d'une courbe sigmoïdale est ajustée aux courbes de titration (réduction et oxydation). L'équation

utilisée est la suivante : $y = \frac{a}{1 + e^{-\left(\frac{x-x_0}{b}\right)}}$. Les paramètres extraits a , x_0 et b sont ensuite confrontés

à l'équation théorique $\frac{[A_{ox}]}{[A]} = \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{-nq(E - E_A^0)}{k_b T}\right)}$ (équation 2 page 43)

2 La caractérisation des protéines d'origine

Les résultats vont être traités protéine par protéine. Les caractéristiques de Het-s 218-289, puis de la rubrédoxine, seront d'abord présentées. Ensuite, celles-ci serviront de références pour caractériser la protéine chimère.

2.1 Le domaine Het-s 218-289

2.1.1 La production de la protéine

Culture et expression

Le plasmide comprenant la séquence codant pour het-s a été obtenu prêt à l'emploi (fourni par l'équipe de recherche *reconnaissance du non-soi chez les champignons* de l'institut de biochimie et génétique cellulaire à Bordeaux). La transformation n'a pas présenté de difficulté, de même que la mise en culture des bactéries. L'absorbance à 600 nm en fin de culture est comprise entre 2 et 2,5. Un gel d'expression montre une forte production de deux protéines de faible poids moléculaire après induction. L'une possède un poids moléculaire très faible, ce qui correspond à notre protéine (8,5 kDa). L'autre semble légèrement inférieure à 18 kDa et pourrait correspondre à des dimères (Figure 51). Il est connu que cette protéine forme des corps d'inclusions, dans lesquels elle est sous forme de fibres amyloïdes [201]. Il n'est donc pas impossible de retrouver des multimères dans le gel si la dénaturation des protéines n'est pas totale.

Purification

La purification de la protéine sur colonne nickel est moyennement efficace en termes de pureté. Les fractions éluées de la colonne sont analysées sur le gel SDS PAGE de la Figure 51 b). De petites bandes contaminantes sont présentes à différents poids moléculaires. Pour les expériences nécessitant une grande pureté, une étape de chromatographie d'exclusion peut être ajoutée. Cela n'est pas fait dans la majeure partie des cas car cette protéine est une référence, et non la protéine d'intérêt.

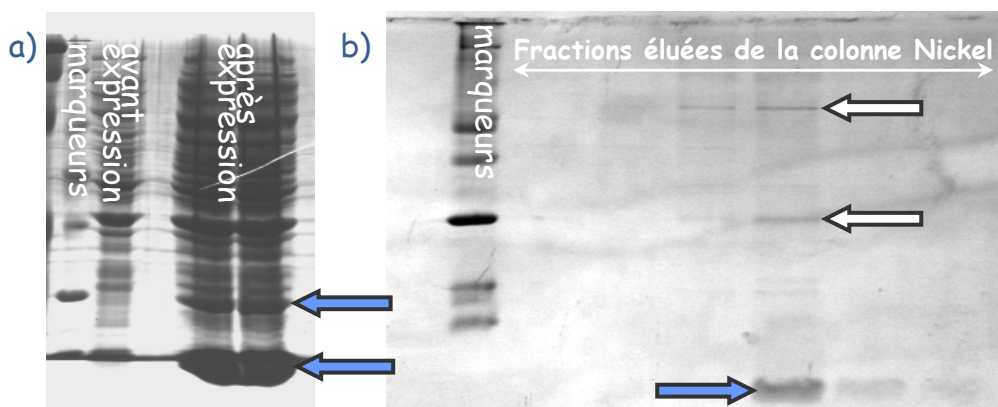


Figure 51 : Gels SDS PAGE de l'expression a) et de la purification b) de Het-s 218-289. Les flèches bleues pointent notre protéine et les flèches blanches des contaminants. Les deux gels ont été révélés au bleu de coomassie.

Le rendement obtenu pour cette purification est de l'ordre de 2 mg de protéines par litre de culture ; ce qui est faible mais en accord avec les rendements obtenus par l'équipe ayant fourni le plasmide. Pourtant, le gel d'expression semble indiquer que l'expression de la protéine est bonne. Il est probable qu'une grande quantité de protéine ne soit pas solubilisée des corps d'inclusion [201].

Stockage et concentration

A l'issue de la purification, le dosage des protéines est effectué par mesure de l'absorbance à 280 nm, et les protéines sont stockées en acide acétique (pH 2,7) à -20°C pour une durée ne présentant jusqu'ici pas de limite. Les protéines peuvent être concentrées sur membrane directement en acide acétique.

Pour les expériences, la formation des fibres amyloïdes est déclenchée par augmentation du pH au dessus de 3.

2.1.2 L'étude des fibres amyloïdes.

Les différents résultats, permettant de caractériser les fibres amyloïdes de Het-s, vont être présentés dans cette partie. Ces caractéristiques serviront ensuite de repère pour caractériser notre protéine chimère.

Fluorescence de la thioflavine

La fluorescence de la thioflavine est une technique standard pour l'étude des fibres amyloïdes qui présente l'avantage de pouvoir être effectuée rapidement et en routine à l'aide du spectrofluorimètre. Dans les expériences présentées ici, l'évolution de la fluorescence de la thioflavine est mesurée avant et après un saut de pH (Figure 52). Celui-ci est réalisé par ajout d'une faible quantité de solution basique qui permet de passer d'un pH de 2,7 à un pH de 8 sans diluer l'échantillon.

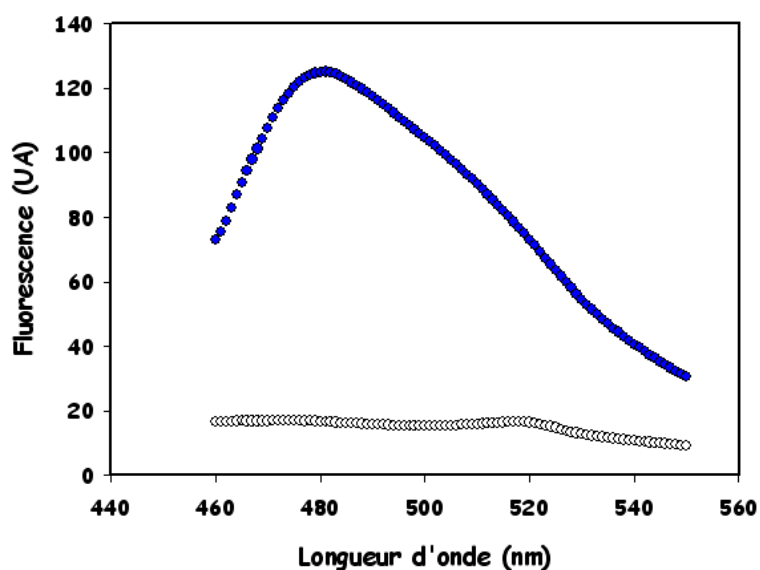


Figure 52 : Comparaison des signaux de thioflavine avant (blanc) et après (bleu) saut de pH pour Het-s 218-289 à la concentration de 50 μ M.

La Figure 52 montre une augmentation de la fluorescence de la thioflavine après le saut de pH. La valeur de son intensité à 480nm passe de 16 à 125, ce qui est caractéristique de la formation de fibres amyloïdes. Pour le contrôle sans protéine, cette valeur passe de 4 à 6, ce qui montre bien l'influence mineure du pH sur la fluorescence de la thioflavine.

Le niveau de fluorescence avant le saut de pH est plus élevé pour l'échantillon protéique que pour l'acide acétique sans protéine. Cela signifie que même à pH 2,7, la molécule interagit avec les protéines et voit sa fluorescence augmenter. Cela peut être dû à une faible interaction avec le monomère de protéine, ou à la présence de petits agrégats ou de petites fibres même dans ces conditions acides.

Lorsque que plusieurs spectres sont réalisés à la suite sur le même échantillon, une diminution de la fluorescence est observée, alors qu'il devrait y avoir une augmentation si de nouvelles fibres se forment. Cela peut provenir d'un blanchiment du fluorophore ou d'une sédimentation des fibres déjà formées.

Cinétiques : caractérisation par diffusion de lumière

A cause du problème de photo-blanchiment, la diffusion de lumière est préférée à la fluorescence pour étudier la cinétique de formation des fibres amyloïdes. La formation des fibres est

déclenchée par dilution des protéines dans un milieu tamponné. L'échantillon est inséré dans la cuve contenant le tampon à l'instant T_0 à la concentration finale de $2\ \mu\text{M}$.

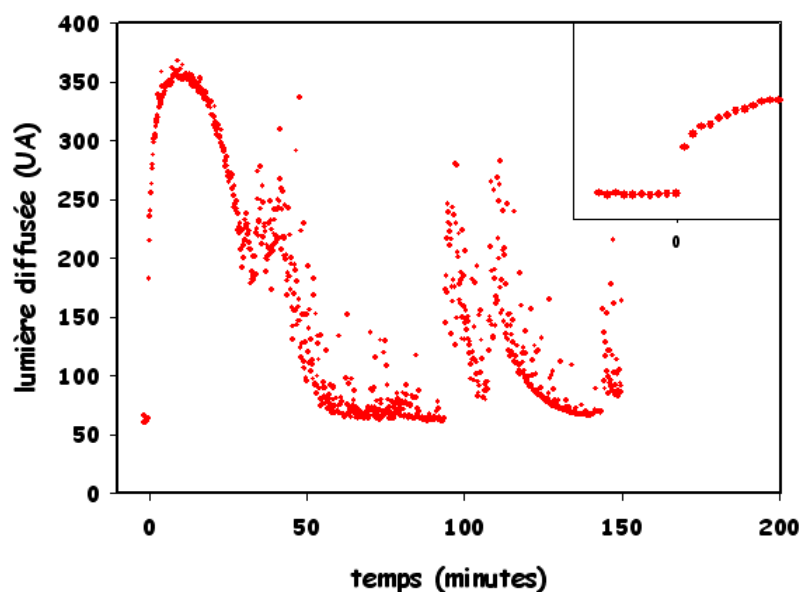


Figure 53 : Diffusion de lumière à 700 nm lors de la formation de fibres amyloïdes par la protéine Het-s 218-289 à $2\ \mu\text{M}$. Encart : zoom sur l'instant T_0 de la cinétique. $\Delta t = 10$ secondes entre deux points

La Figure 53 montre que l'augmentation de lumière diffusée est immédiate à l'insertion de l'échantillon de protéines. L'augmentation se poursuit pendant 10 minutes avant d'entamer une décroissance jusqu'à un retour proche du niveau initial. Le niveau de bruit est alors plus important qu'à l'origine. Des regains de diffusion sont observés. Ils sont suivis d'une décroissance rapide.

Ces résultats montrent que les fibres amyloïdes commencent à se former immédiatement. Cela est différent de la majorité des cinétiques de formation de fibres amyloïdes pour lesquelles un délai est observé au début de la polymérisation. L'absence de ce délai peut provenir de l'existence d'espèces pré-fibrillaires dans l'échantillon initial. Celles-ci accélèrent considérablement la cinétique en raccourcissant l'étape de nucléation des fibres qui est généralement défavorable donc lente.

Le maximum de diffusion est atteint en 10 minutes ce qui est très rapide compte tenu de la faible quantité de protéine. Le fait que la diffusion diminue ensuite est révélateur d'une sédimentation des fibres. Cette sédimentation est elle-même liée à une agrégation des fibres amyloïdes à un niveau supérieur. Ces gros agrégats, visibles à l'œil nu, peuvent être re-suspendus par l'agitation.

Il y a alors un regain de lumière diffusée et une nouvelle phase de décroissance par sédimentation (phénomène observé aux 35^{ème}, 95^{ème}, et 110^{ème} minutes).

2.1.3 L'étude des gels à pH 2,7

Les protéines sont stockées en acide acétique pH 2,7 pour éviter la formation de fibres amyloïdes. Il a été confirmé par des expériences de fluorescence de la thioflavine et de microscopie et électronique qu'il n'y a effectivement pas de fibres amyloïdes dans les stocks de protéines (concentration entre 20 et 50 μM). Cependant, il a pu être observé qu'à forte concentration ($>300 \mu\text{M}$), Het-s 218-289 s'organise sous forme de gel à pH 2,7. Or, la formation d'un gel nécessite une organisation des protéines qui est plus probable avec les fibres amyloïdes [95]. De plus, il est connu qu'une forte concentration des protéines peut entraîner un changement de conformation de celles-ci et mener à la formation d'un gel [202].

La formation de fibres amyloïdes à pH 2,7 et 300 μM de protéine Het-s 218-289 a pu être mise en évidence par TEM (Figure 54). Les fibres observées sont plus courtes (50-100nm) et possèdent un diamètre légèrement plus élevé (environ 10 nm) que celles formées dans l'eau.

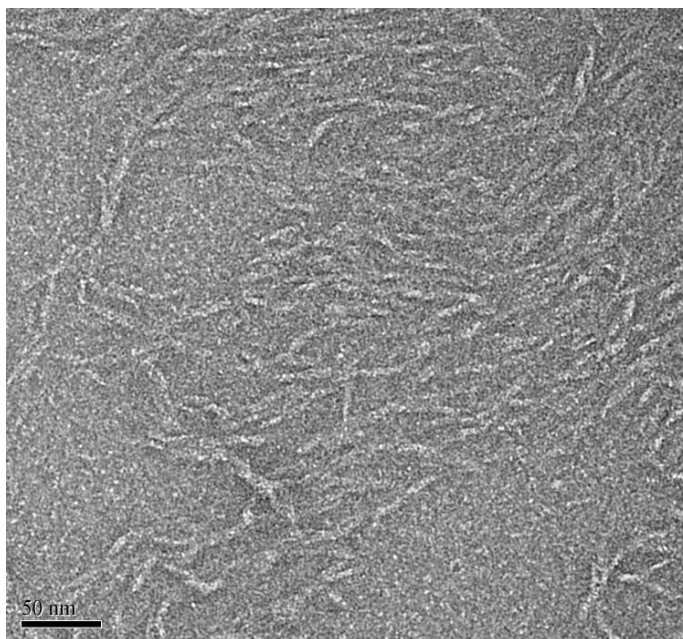


Figure 54 : Image TEM de fibres amyloïdes formées à pH 2,7 à forte concentration.

Le fait que la protéine Het-s 218-289 soit capable de s'organiser sous forme de gel est une qualité importante. Le gel est une structure avantageuse car il dispose de caractéristiques mécaniques particulières en vue d'applications. Si cette propriété de gel est conservée avec les nanofils, elle permettrait de réaliser un gel biocompatible, biodégradable et conducteur d'électricité.

2.1 La rubrédoxine de *methanococcus voltae*

La rubrédoxine de *methanococcus voltae* est une petite protéine globulaire de 44 acides aminés (50 avec la queue histidine) qui se différencie des autres rubrédoxines par son pI légèrement basique (autour de 7,3). Mise à part la production de la protéine, cette partie portera principalement sur la caractérisation du centre fer de la protéine. Le bon fonctionnement de celui-ci est un élément essentiel pour la suite du projet.

2.1.1 La production de la protéine

Clonage

Le clonage de la rubrédoxine n'a pas présenté de problèmes particuliers. La présence de l'insert codant pour la rubrédoxine dans le plasmide a été vérifiée par séquençage.

Culture et expression

La mise en culture de bactéries transformées avec le plasmide ne présente pas de difficultés particulières. La valeur finale d'absorbance à 600 nm est entre 2 et 2,5.

Un gel SDS-PAGE permet de vérifier la bonne expression de la protéine et de montrer que celle-ci est soluble. Ces éléments sont attestés par la seule couleur du culot de bactéries. En effet, celui-ci est teinté d'une couleur rouge révélatrice de la protéine au centre fer. Cette couleur est un indicateur que l'on retrouvera tout au long de la purification et des expériences.

Purification

Au moment de la lyse en acide acétique (pH 2,7), une majeure partie des protéines, acides nucléiques et membranes des bactéries précipitent. Cependant, la protéine surexprimée reste soluble et repliée en raison de sa stabilité. Il y a donc une première étape de purification après la centrifugation du lysat. Une étape de chromatographie sur colonne nickel est ensuite réalisée. La pureté finale est estimée par le rapport a_{280}/a_{490} dont la valeur théorique est 1,51 pour une protéine pure. Cette valeur n'est pas systématiquement atteinte après la colonne nickel. La valeur est généralement inférieure à deux, ce qui est suffisant pour la majorité des expériences réalisées. Un litre de culture de bactéries peut permettre de purifier jusqu'à 10 mg de protéines, ce qui est un rendement acceptable.

2.1.2 La stabilité de la rubrédoxine

S'il est reconnu que les rubrédoxines sont des protéines plutôt stables, celle de *methanococcus voltae* (jusqu'ici non étudiée) présente une stabilité hors du commun. Il n'y a pas eu d'étude approfondie de cette stabilité (par exemple en étudiant l'impact de la chaleur). Cependant, quelques éléments peuvent être apportés en regardant l'évolution du spectre d'absorbance dans différentes conditions physico-chimiques. Si les protéines se dégradent, l'atome de fer est libéré et les raies d'absorbance associées disparaissent.

Le Tableau 6 indique si la protéine est résistante ou non à différents traitements et dans différentes conditions. Lorsque le pH est autour de 7, la protéine est résistante à tous les traitements habituellement faits aux protéines (congélation, concentration, lyophilisation). A pH 2,7 ou en urée 8 M, qui sont des conditions dénaturantes pour la majorité des protéines, la rubrédoxine garde son centre fer à température ambiante. La stabilité de la protéine est légèrement meilleure à pH acide qu'en urée 8 M. Un pH de 2,7 permet un stockage de la protéine à 4 °C alors que l'urée cristallise à cette température. Cependant, que ce soit à pH acide ou en urée 8 M, la protéine se dégrade fortement lors des différents traitements habituels des protéines.

Tableau 6 : Conditions de stabilité de la rubrédoxine pour différents traitements.

stabilité de la rubrédoxine	eau	Tp acide acétique pH 2,7	Tp tris pH8 urée 8 M
stockage à T ambiant	oui (qqs jours)	oui (qqs jours)	oui (qqs heures)
stockage à 4°C	oui	oui	non
congélation/décongélation	oui	non	non
concentration sur membrane	oui	non	non
lyophilisation	oui	non	non

Cette stabilité permet de faciliter la purification de la protéine. Elle est capitale pour la purification de la protéine chimère.

2.1.3 L'étude du centre fer

Afin que la rubrédoxine soit fonctionnelle (cad qu'elle puisse échanger des électrons), celles-ci doit être correctement repliée et posséder un centre fer capable d'échanger les électrons. Le second point impliquant nécessairement le premier, la protéine n'a pas fait l'objet d'une étude de repliement. La caractérisation du centre fer présentée dans ce chapitre atteste, de manière implicite, que la protéine est bien repliée.

Etude de la coordination

Les liaisons fer-soufre de la rubrédoxine absorbent les photons à des longueurs d'ondes caractéristiques. En cas de mauvaise liaison du métal sur la protéine (par exemple avec un autre acide aminé), les énergies de liaison changent et les bandes caractéristiques d'absorption associées changent avec elles [203].

La Figure 55 a) montre un spectre d'absorption à 46 μM de la rubrédoxine à l'état oxydé. Les bandes d'absorption observées correspondent à celles attendues pour une rubrédoxine (Tableau 4 page 69). Les coefficients d'extinction de ces différentes bandes correspondent également. Il y a donc bien un atome de fer oxydé lié par les quatre cystéines de la protéine.

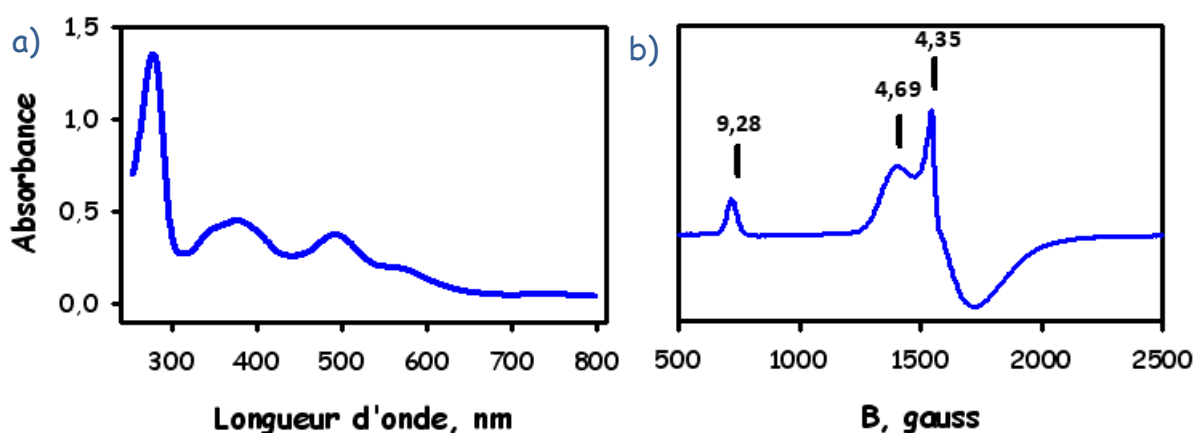


Figure 55 : Spectres caractéristiques de rubrédoxine. a) Spectre d'absorbance UV-visible. b) Spectre RPE à 4°K

La bonne coordination de l'atome de fer dans la protéine est également confirmée par la résonance paramagnétique électronique. La dérivée du spectre présente des signatures caractéristiques pour des facteurs g de 9,28 , 4,69 et 4,35. Le facteur g de 9,28 correspond à la transition se produisant dans une direction du doublet de Kramer de plus basse énergie. Les g théoriques correspondant aux autres directions sont vers 1 et ne sont donc pas observables dans

cette expérience. Lorsque la température monte, le signal à 9,28 perd en intensité au profit des signaux à 4,69 et 4,35 qui correspondent au doublet d'énergie supérieur dans deux directions différentes. La troisième direction est attendue pour un facteur g autour de 4 mais n'est pas clairement observable ici.

Ces différentes observations sont cohérentes avec celles faites habituellement pour les rubrédoxines. Elles correspondent à un atome de fer III dans un champ rhombique fortement distordu. Elles permettent donc d'affirmer que l'atome de fer est bien coordonné dans un site de fixation tétraédrique.

Ratio protéine/fer

Il est également important de vérifier que toutes les rubrédoxines ont bien complexé un atome de fer. La concentration en atomes de fer dans les rubrédoxines est estimée à partir de l'absorbance à 490 nm. La concentration en protéines est estimée à partir de l'absorbance à 280 nm. Si les deux concentrations sont équivalentes, cela signifie que l'échantillon est pur et que chaque rubrédoxine possède un atome de fer bien coordonné. Si la quantité de protéine est supérieure à la quantité de fer, cela signifie que l'échantillon n'est pas pur ou qu'il y a des rubrédoxines qui ont perdu leur atome de fer.

La quantité en fer dans tous l'échantillon peut également être vérifiée par spectroscopie de masse avec une ionisation par torche plasma (généralement appelé ICP-MS). Cela permet de s'assurer qu'il n'y a pas de fer en solution. Une telle présence signifierait que des protéines perdent leur cofacteur métallique. Cela remettrait également en cause la validité des résultats de spectroscopie RPE car le fer en solution donne un signal différent. Les différents échantillons de protéines passés en ICP-MS ont toujours montré une bonne corrélation avec les concentrations extraites à partir du spectre UV-visible.

Caractéristique redox

La transition redox FeIII/FeII de la rubrédoxine est étudiée par titration redox (Figure 56). La titration montre une réduction totale de l'échantillon car l'absorbance à 490 nm chute jusqu'à 0 ; et une ré-oxydation totale car ce pic retrouve son niveau d'absorbance initial. Les courbes d'oxydation et de réduction possèdent une forme sigmoïdale et suivent le même chemin.

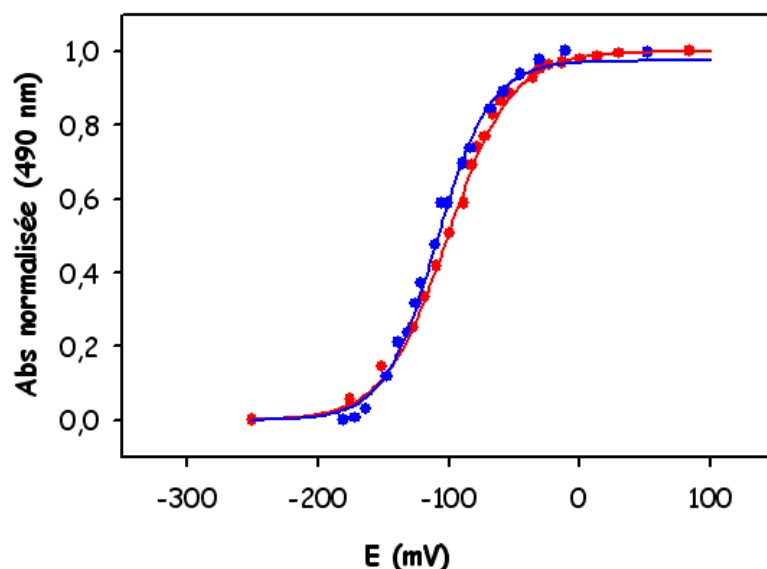


Figure 56 : Titration redox. En rouge, la réduction. En bleu, l'oxydation. Les points sont expérimentaux et les courbes correspondent aux ajustements de fonction.

L'ajustement de la fonction sigmoïdale aux données possède un coefficient de corrélation de 0,998 pour l'oxydation et 0,999 pour la réduction. Cet ajustement est fait sur trois paramètres : L'absorbance maximale (DO_{\max}) pour laquelle la valeur 1 est attendue dans le cas de spectres normalisés, le potentiel redox E^0 , et le paramètre b dépendant du nombre d'électrons échangés (Tableau 7).

Le potentiel redox extrait est de -105 mV, ce qui tombe légèrement en dessous de la gamme -100/50 mV habituellement rencontrée pour les rubrédoxines. Le nombre d'électrons échangés est 1,05 pour l'oxydation et 1,26 pour la réduction. Ces valeurs sont légèrement supérieures à 1 qui est la valeur attendue pour une transition FeIII/FeII. La différence n'est cependant pas significative.

Tableau 7 : Paramètres extraits de l'ajustement de courbes sigmoïdales aux expériences de titration.

$f(E) = \frac{DO_{\max}}{1 + \exp\left(-\frac{E - E^0}{b}\right)}$	Coefficient de corrélation	DO_{\max} (théorique=1)	$b = k_b T / nq$ (théorique=0,025)	E^0
Oxydation	0,9976	0,999	0,024	-0,101
Réduction	0,999	0,9741	0,02	-0,109

Cette expérience permet d'affirmer que la protéine recombinante produite est bien capable d'échanger des électrons avec d'autres entités.

3 La caractérisation de la protéine chimère Rd-het

3.1 La production de la protéine

3.1.1 Le clonage et la culture

Clonage

Bien que cela soit plus complexe que pour un clonage standard, le plasmide codant pour la protéine chimère a pu être réalisé. Les deux ajouts d'insert ont pu être vérifiés l'un après l'autre par digestion et analyse sur gel d'agarose. Le plasmide final a été vérifié par séquençage.

Culture et expression

La transformation des bactéries avec le plasmide s'est déroulée de façon standard. La mise en culture de bactéries transformées avec le plasmide se déroule de manière similaire à la culture de bactéries produisant la rubrédoxine. L'absorbance à 600 nm en fin de culture est autour de 2 ce qui est légèrement inférieur aux autres protéines.

3.1.2 La purification

La lyse des bactéries en urée 8 M a pour conséquence de solubiliser la majeure partie de ce qui se trouve dans les bactéries. Après une centrifugation, le culot est très petit, mais tout de même légèrement rouge, ce qui prouve que là aussi, une partie des protéines exprimées est insoluble.

Même soluble, une grande partie des protéines Rd-het ne s'accroche pas sur la colonne nickel. Cela vient à priori d'une indisponibilité de la queue histidine qui peut être reliée à un état conformationnel particulier [132]. Il arrive également que l'échantillon s'aggrave sur la colonne et la bouche. Cela peut être lié à une formation de fibres amyloïdes sur la colonne malgré les conditions dénaturantes.

Le fait que de nombreuses autres protéines soient solubilisées augmente fortement la quantité de contaminants se fixant sur la colonne nickel (Figure 57). La pureté des échantillons obtenus est très irrégulière avec un rapport a_{280}/a_{490} généralement compris entre 5 et 10 (rapport théorique = 2,57). Cette faible pureté peut être gênante pour la réalisation de certaines expériences. Une étape supplémentaire de chromatographie d'exclusion permettrait de l'améliorer mais est

difficile à mettre en œuvre dans la mesure où il n'y a pas de moyen pour concentrer les protéines. Le rendement est très aléatoire en raison du taux variable de protéines s'accrochant sur la colonne. Il va de 1 à 4 mg de protéines par litre de culture de bactérie.

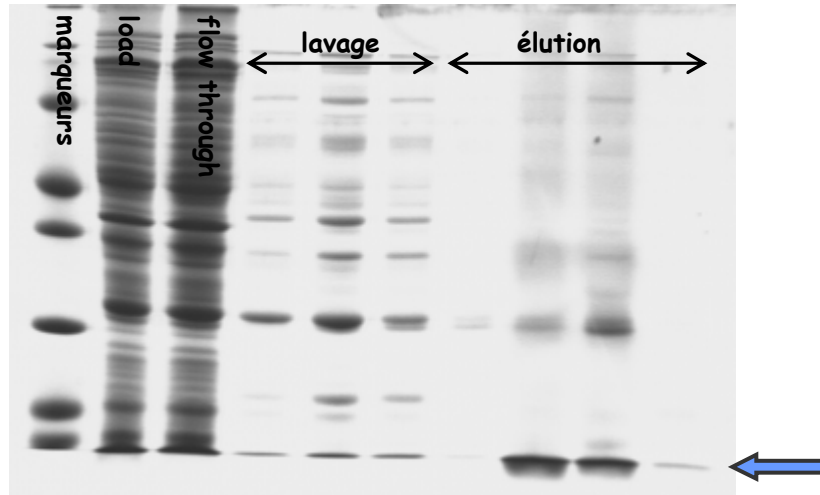


Figure 57 : Gel SDS PAGE de la purification de Rd-het. La protéine d'intérêt est montrée par une flèche bleue. Le gel a été révélé par coloration au bleu de coomassie.

Un autre protocole

Un autre protocole de purification a également été testé. Dans ce protocole, l'ensemble du protocole de purification (y compris la lyse) se produit en acide acétique à pH 2,7 et non en urée 8 M (protocole détaillé en annexe 2.3). Ce protocole permet un rendement de 8 à 10 mg par litre de culture et donne des protéines pures à plus de 90%.

Cependant, les protéines issues de ce protocole ne forment pas ou forment très difficilement des fibres. Il est possible que le domaine Het-s 218-289 se mette dans état conformationnel particulier lors de la lyse en acide acétique. Cet état ne serait pas capable d'évoluer vers l'état natif nécessaire à la formation des fibres amyloïdes. Après avoir tenté sans succès différentes conditions pour rétablir la fonction fibrillaire, il a été décidé de ne pas exploiter les protéines issues de ce protocole pour ce travail de thèse.

3.2 La formation des fibres amyloïdes

La formation des fibres amyloïdes est l'aspect à vérifier en premier car il n'y a pas de nanofil sans fibre. Les différents résultats permettant de caractériser cette fonction vont être présentés dans cette partie. Pour chaque technique mise en œuvre, les caractéristiques de la protéine chimère sont comparées à celles de het-s 218-289.

La fluorescence de la thioflavine ne peut pas être utilisée dans le cas des protéines chimères à cause de la forte absorbance de la rubrédoxine de 300 à 600 nm. Les photons d'excitation et d'émission de la thioflavine (respectivement à 450 et 480 nm) sont absorbés par la protéine.

3.2.1 La diffusion de lumière

La diffusion de lumière sert de contrôle de routine pour vérifier la formation des fibres amyloïdes. Des cinétiques ont été réalisées pour Rd-het dans les mêmes conditions que pour Het-s 218-289 (Figure 58).

La cinétique de fibres amyloïdes de Rd-het est similaire à celle de Het-s 218-289. Il y a d'abord une augmentation qui commence dès l'instant T_0 . Celle-ci dure 30 minutes contre seulement 10 pour Het-s. De plus, la valeur maximale d'intensité n'est que de 250 contre 350 pour la protéine originale. Ensuite, une décroissance est observée jusqu'à un retour proche de l'état initial. Cette phase qui indique une sédimentation des fibres est plus longue pour Rd-het que pour Het-s 218-289. Des regains de lumière diffusée sont également observés mais sont nettement moins marqués. Ces phénomènes, observés vers la 70^{ème} et la 130^{ème} minute, sont dus à la re-suspension d'agrégats comme pour Het-s 218-289.

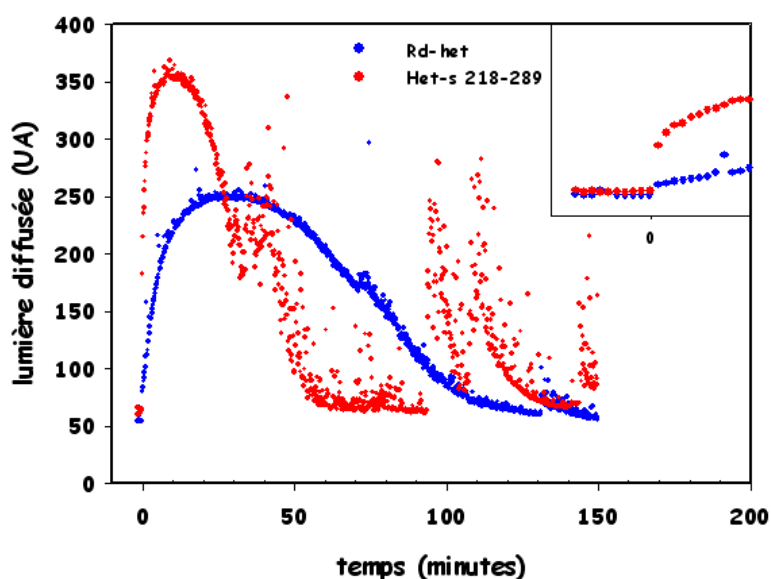


Figure 58 : Expériences de diffusion de lumière de Rd-het en comparaison avec Het-s 218-289.

Ces éléments montrent que la protéine Rd-het forme des fibres amyloïdes. Cependant, les cinétiques de formation et d'agrégation de ces fibres sont plus lentes que pour Het-s 218-289.

Cela peut venir d'une constante d'affinité plus faible des protéines à cause de la présence du domaine rubrédoxine. De plus, les rubrédoxines modifient probablement les charges de surface des fibres et entraînent ainsi des interactions différentes.

3.2.2 La morphologie par microscopie électronique

Des images de microscopie électronique ont été réalisées pour les pH de 6 (eau), 8 (tris) et 2,7 (acide acétique). L'influence du chlorure de sodium a également été observée.

Il n'y a pas de fibres amyloïdes à pH 2,7 comme attendu. Les autres conditions présentent toutes la même unité de base qui est une fibre de 8 nm de diamètre. Il s'agit apparemment d'un enroulement de trois protofibrilles (Figure 59). Cela est légèrement différent de Het-s 218-289 où il y a préférentiellement une seule protofibrille dans ces gammes de pH.

De nombreux agrégats amorphes sont présents mais ils ne sont pas majoritaires (environ 15%) (Figure 60 a). Ils peuvent provenir de contaminants ou d'un mauvais repliement de certaines protéines chimères.

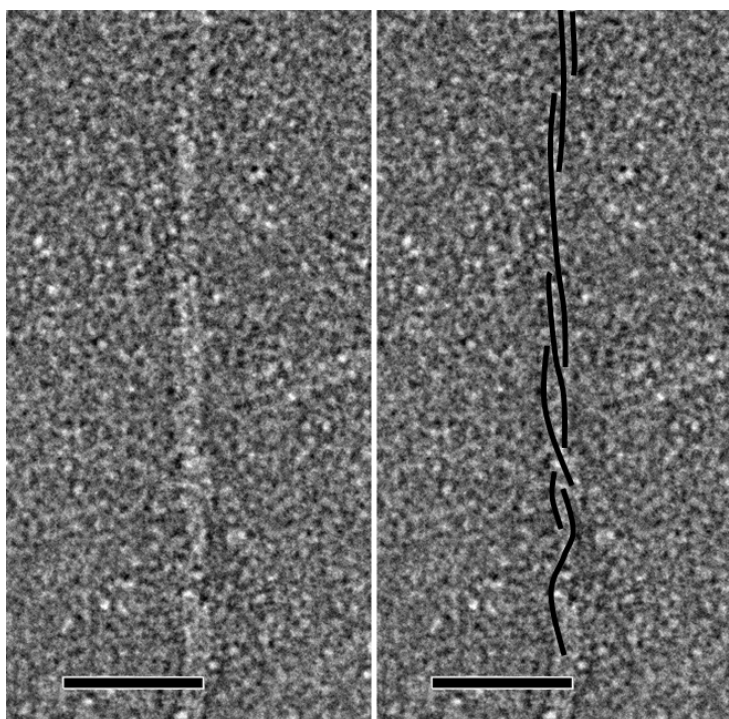


Figure 59 : Image TEM d'une fibre amyloïde à pH 6. Mise en évidence des protofibrilles. Barre d'échelle=50 nm

Les observations réalisées sur différents échantillons montrent une grande diversité dans la longueur et dans l'interaction de ces fibres ; y compris sur des échantillons aux conditions

similaires. Il est donc difficile de corrélérer la morphologie avec les conditions physico-chimiques. La longueur peut être comprise entre 200 et 400 nm ou faire plusieurs micromètres de long. La présence de chlorure de sodium a tendance à accentuer l'agrégation des fibres en fagots, ce qui accroît considérablement le diamètre et la longueur globale (Figure 60 b).

Ce phénomène d'agrégation est tout aussi variable que la longueur des fibres amyloïdes. Une hypothèse avancée pour expliquer ces variations réside dans les actions mécaniques telles que le vortex ou le pipetage qui peuvent casser les fibres de différentes manières. Le vieillissement de l'échantillon peut aussi impacter le niveau d'agrégation.

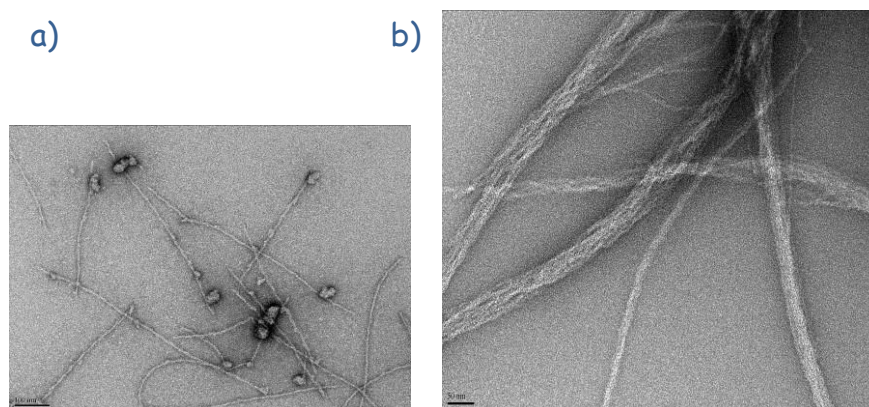


Figure 60 : a) Mise en évidence des agrégats amorphes autour des fibres amyloïdes. b) Ensembles de fibres amyloïdes.

3.2.3 La visualisation sur substrat : caractérisation par AFM

Dans le cadre d'applications technologiques, les fibres amyloïdes seront probablement amenées à être déposées sur des substrats. L'AFM permet de contrôler la bonne tenue des fibres amyloïdes au séchage (Figure 61).

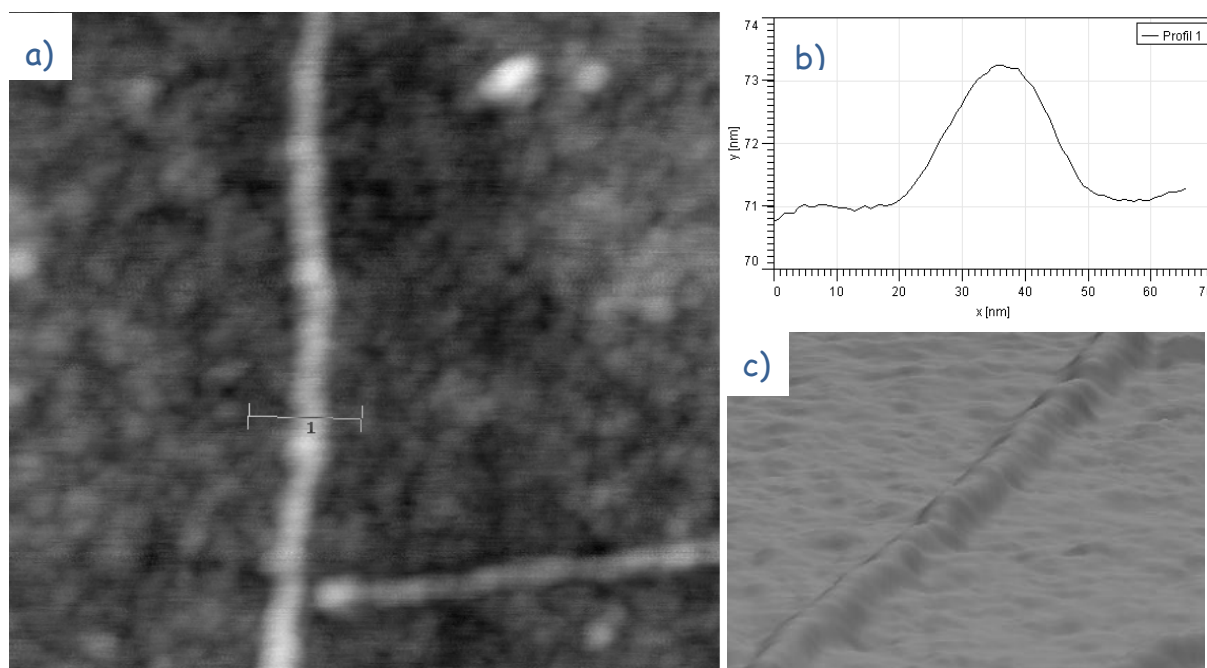


Figure 61 : Images AFM. a) Vue de dessus en niveau de gris avec la ligne du profil extrait en b). c) image en relief d'une fibre amyloïde. Barre d'échelle 30 nm.

Les fibres amyloïdes sont observables en AFM en mode “tapping”. Celles-ci présentent une longueur cohérente avec celle des fibres observées en TEM. C'est-à-dire de 200 nm à 1 μ m. Le profil extrait d'une coupe de la fibre (Figure 61 b) montre une largeur de 30 nm et une épaisseur légèrement supérieure à 2 nm. La grande largeur vient du rayon de courbure de la pointe qui grossit en s'usant. L'épaisseur d'environ 2 nm est sensée refléter le diamètre des fibres, mais elle est inférieure au 8 nm observés en microscopie électronique. Cela peut provenir d'un affaissement des fibres lors du séchage. Il est également possible que la pointe AFM écrase les protéines (qui sont des objets mous) et fasse ressortir une épaisseur plus petite qu'elle ne l'est en réalité).

Les fibres amyloïdes ne peuvent pas être imagées par l'AFM en mode “contact” ; la pointe entraînant les objets avec elle.

Des fibres ont pu être imagées pendant plusieurs semaines, ce qui prouve qu'elles conservent une certaine stabilité une fois séchées.

3.3 La caractérisation de la rubrédoxine

La rubrédoxine doit être intacte pour assurer le transfert électronique. Que les fibres soient formées ou non, la présence d'un autre domaine peut entraîner un mauvais repliement de la

protéine à centre fer. Afin de vérifier son intégrité, les différentes méthodes ayant servi à la caractérisation de la rubrédoxine sont utilisées sur la protéine chimère.

Etude de la coordination

Le spectre d'absorbance de la protéine chimère comprend bien les bandes caractéristiques de la rubrédoxine avant et après formation des fibres amyloïdes (Figure 62 a). Ces dernières diffusent plus fortement la lumière, ce qui modifie le spectre. Cette diffusion est plus importante à faible longueur d'onde, ce qui tend à modifier le rapport a_{280}/a_{490} . Il n'est donc pas possible d'estimer précisément la quantité de rubrédoxines possédant un centre fer. A première vue, cette quantité ne semble pas fortement impactée par la formation des fibres amyloïdes.

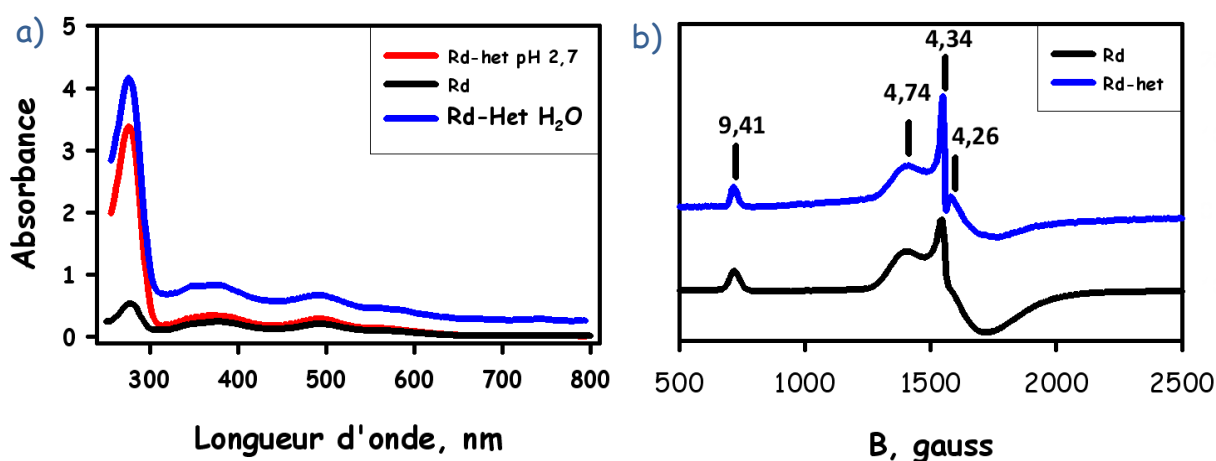


Figure 62 : a) Spectres d'absorbance de Rd, Rd-het avant dialyse et Rd-het après formation des fibres amyloïdes par dialyse. b) Spectres RPE de Rd et Rd-het après formation des fibres amyloïdes.

Le spectre RPE de la protéine chimère est similaire avant et après formation des fibres amyloïdes (Figure 62 b). Il présente les différentes raies caractéristiques attendues pour la rubrédoxine. Le pic observé pour un facteur g de 4,35 est plus fin et plus haut que pour la rubrédoxine seule. Cette petite différence pourrait venir d'une petite distorsion dans le centre fer ou d'un changement dans l'environnement électronique éloigné de l'atome de fer.

Un signal, qui n'était pas clairement visible pour la protéine isolée, apparaît pour un facteur g de 4,26. Ce signal pourrait correspondre à la transition se produisant dans la troisième direction du deuxième doublet de Kramer. Cependant, cette transition est attendue pour un facteur g de 4.

Tous ces éléments montrent que la rubrédoxine est bien repliée, et que son centre fer est bien coordonné dans la protéine chimère. La formation des fibres amyloïdes ne semble pas avoir d'impact conséquent sur le domaine rubrédoxine.

Caractéristiques redox

La transition redox de Rd-het est étudiée par titration redox après formation des fibres amyloïdes. Cependant, les fibres subissent un phénomène d'agrégation au cours de l'expérience entraînant une forte augmentation de la diffusion. Les spectres d'absorbance sont alors très déformés. Ce phénomène reste suffisamment faible lors de la phase de réduction mais devient trop important pour la phase de ré-oxydation. L'ajustement de la fonction sigmoïdale n'est donc réalisé que sur la première des deux phases (Figure 63).

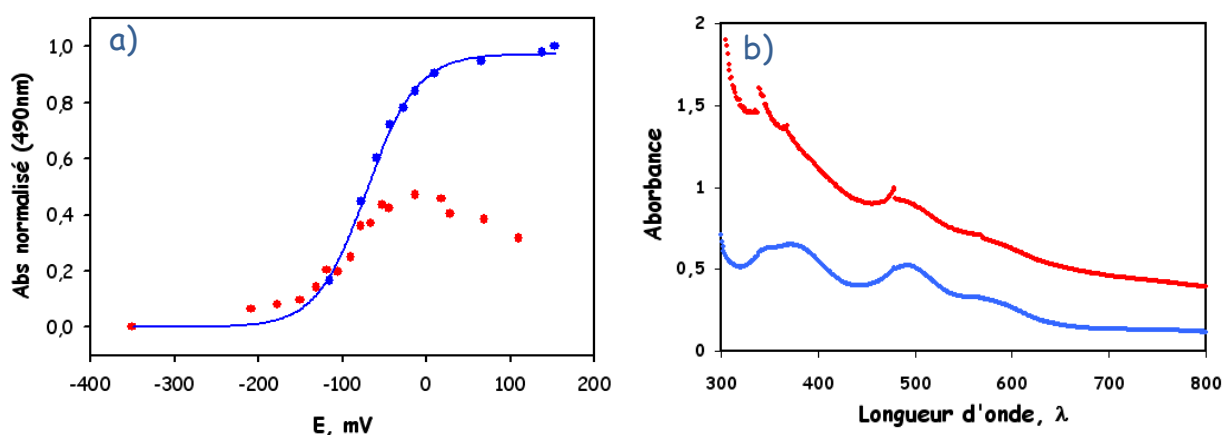


Figure 63 : a) Titration redox de Rd-het et courbe sigmoïdale ajustée. b) Spectres d'absorbance des états initial (bleu) et final (rouge) de la titration mettant en évidence l'augmentation de la diffusion.

Cet ajustement possède un bon coefficient de corrélation. Les paramètres extraits E^0 et b donnent les valeurs -72 mV et 0,03 respectivement. Le potentiel redox de la protéine est donc déplacé de 30 mV vers les valeurs positives par rapport à celui de la rubrédoxine seule. Bien qu'elle ne soit pas fondamentalement importante, cette différence met en évidence un réel changement dans la protéine. Elle est peut-être déformée par des interactions ou des contraintes stériques, dues à la proximité de la fibre amyloïde et des autres rubrédoxines.

Un coefficient b de 0,03 correspond à un échange à 0,8 électron au lieu de 1. Cette légère différence n'est probablement pas significative.

Tableau 8 : Paramètres de l'ajustement de la fonction sigmoïdale.

$f(E) = \frac{DO_{\max}}{1 + \exp\left(-\frac{E - E^0}{b}\right)}$	Coefficient de corrélation	DO_{\max} (théorique=1)	$b = k_b T / nq$ (théorique=0,025)	E^0
Réduction	0,999	0,973	0,03	-0,072

Les différentes expériences menées précédemment permettent de montrer que la rubrédoxine est toujours repliée et fonctionnelle après la formation des fibres amyloïdes. Malgré les quelques différences observées sur ses caractéristiques biophysiques et électrochimiques, sa capacité à échanger les électrons semble préservée.

4 Le bilan

La bio-ingénierie a permis de créer et produire une protéine chimère comprenant un domaine à fibres amyloïdes et un domaine rubrédoxine. Les deux protéines correspondant aux domaines ont été produites et étudiées de manières isolées afin de servir de référence pour l'étude de la protéine chimère. L'objectif est de s'assurer que les deux domaines de la protéine chimère conservent bien leur fonction une fois associés.

Un protocole a été mis au point pour purifier la protéine chimère. Il comprend une lyse en urée 8 M et une étape de chromatographie sur colonne Nickel. Le rendement et la pureté des échantillons ne sont pas très bons.

La cinétique de formation des fibres amyloïdes de la protéine chimère est similaire à celle du domaine original. Par contre, la microscopie électronique révèle un enroulement de trois protofibrilles par fibres contre une seule pour le domaine d'origine. Cela peut s'avérer être un avantage pour le transfert électronique car cela augmente le nombre de rubrédoxines par unité de longueur.

La spectroscopie UV-visible, la résonance paramagnétique électronique et la titration redox ont permis d'étudier le domaine rubrédoxine sur les fibres amyloïdes. Celui-ci présente des caractéristiques similaires à la rubrédoxine isolée. Des légères différences peuvent être notées sur le spectre RPE et lors de la titration redox. Mais le fait de l'avoir "greffé" sur une fibre amyloïde n'empêche à priori pas cette protéine de transférer ses électrons.

Le nanofil semble est donc prêt pour passer à la phase d'étude suivante qui est de démontrer que les électrons peuvent passer d'un bout à l'autre de la fibre par transferts électroniques entre les rubrédoxines.

Partie 2 : Caractérisation électronique du nanofil

Après avoir fabriqué un fil protéique décoré de rubrédoxines, il faut caractériser la capacité de conduction de celui-ci. Plusieurs méthodes permettent de caractériser le courant traversant des nanofils. Deux types d'approche ont été utilisés : l'étude d'un ensemble de nanofils, ou l'étude de nanofils isolés. Les deux approches ont été abordées par différentes techniques qui vont être présentées dans cette partie

1 Matériels et méthodes

1.1 La caractérisation par voltamétrie cyclique

La voltamétrie cyclique permet l'étude d'entités redox en solution. Le courant traversant une électrode de travail est mesuré tandis que le potentiel de l'électrode varie. Le fait que les espèces soient en solution est une différence notable avec les mesures tension/courant effectuées classiquement sur des composés électroniques. L'interaction des espèces avec l'électrode et leur diffusion dans le milieu sont des paramètres qui impactent fortement la mesure. D'un autre côté, ces phénomènes peuvent révéler certains mécanismes de transfert électronique.

1.1.1 La théorie de la voltamétrie cyclique

Les bases du transfert redox ont été abordées en introduction (physico-chimie des réactions redox page 42). Les équations et notations alors présentées sont toujours en vigueur dans cette partie.

Problème de la diffusion

L'équilibre entre deux espèces redox tend à déplacer l'électron vers le couple redox de plus haut potentiel. L'électrode de travail peut être considérée comme un couple redox dont le potentiel varie. Elle accepte ou donne ses électrons selon que son potentiel est plus haut ou plus bas que l'espèce en solution.

Cependant, l'échange entre une espèce protéique A en solution et l'électrode ne peut se faire que s'il y a un contact entre les deux entités. La diffusion des molécules vers l'électrode est donc un

paramètre à prendre en compte. Sur le plan théorique, la compréhension des phénomènes implique de combiner les échanges redox avec les équations de Fick qui régissent les phénomènes de diffusion [204]. Les principaux résultats émanant de calculs analytiques ou de simulations vont être présentés.

Échelon de tension

Afin de comprendre le rôle de la diffusion, l'exemple le plus simple à traiter est celui de l'échelon de tension. Lorsque le potentiel de l'électrode est changé brutalement, les protéines à son contact échangent leur(s) électron(s) rapidement. Ensuite, il faut attendre que d'autres protéines diffusent jusqu'à l'électrode pour échanger à leur tour. A terme, toutes les protéines ont été en contact avec l'électrode. L'échantillon se retrouve alors dans la situation d'équilibre définie par l'équation 2. Une solution analytique de l'évolution de la densité de courant au cours du temps peut être obtenue [205]:

$$j(t) \propto q.Na. \frac{[A]}{1 + e^{-\frac{nq(E-E_0)}{k_b T}}} \sqrt{\frac{D}{t}} \quad \text{Eq 3}$$

- $j(t)$ est la densité de courant électrique traversant l'électrode de travail
- Na est le nombre d'Avogadro
- D est le coefficient de diffusion de l'espèce A

Le terme sigmoïdal découle de la loi de Nernst qui définit la force motrice poussant les protéines à transférer leur(s) électron(s) à l'électrode. Le dernier terme provient de la diffusion des espèces en solution. Il tend vers 0 à mesure que l'équilibre se fait ; c'est-à-dire à mesure que les espèces en solution diffusent vers l'électrode et échangent leur(s) électron(s).

Phases d'un voltamogramme

Les équations deviennent encore plus difficiles à traiter lorsqu'une variation du potentiel est introduite. Il n'est alors plus possible d'obtenir de solution analytique mais des résultats simulés peuvent être obtenus par des calculs d'éléments finis ou de différences finies [205]. Durant les expériences de voltamétrie cyclique, le potentiel effectue un aller-retour en variant linéairement au cours du temps. Le courant mesuré à l'électrode peut être décrit en plusieurs phases (Figure 64) :

- Etat initial : Toutes les espèces sont oxydées ou réduites, la situation est à l'équilibre, le courant est égal à zéro.

- Croissance du courant (A): A mesure que le potentiel de l'électrode se rapproche du potentiel redox, les espèces échangent des électrons avec l'électrode de façon croissante.
- Premier extremum (B): La force motrice est grande car le potentiel redox est dépassé. Il reste encore suffisamment d'espèces disponibles à la surface de l'électrode pour échanger leur(s) électron(s). Pour un système idéal, le potentiel de ce moment est à 28 mV du potentiel redox E^0 .
- Décroissance (C): Les échanges avec l'électrode sont immédiats mais limités par la diffusion, c'est-à-dire l'apport des espèces à la surface de l'électrode.
- Potentiel extrême : Le potentiel change de sens de balayage. Il ne s'agit pas d'une solution d'équilibre car une grande partie de l'échantillon n'a pas encore diffusé jusqu'à l'électrode.
- Croissance inverse (D): Phénomène identique à la première croissance mais les échanges sont inversés. L'état initial de cette phase est cependant différent.
- Deuxième extremum (E): Même équilibre que dans la première partie de balayage. Le courant est opposé à celui du premier extremum. Pour un système idéal, le potentiel de ce moment est à 28 mV du potentiel redox E^0 et à 56 mV du premier extremum.
- Décroissance inverse (F): Même limitation de la diffusion que lors de la première décroissance.
- Etat final : Le potentiel est identique au potentiel d'origine. Une majeure partie de l'échantillon n'a subi aucun changement car elle n'a pas diffusé jusqu'à l'électrode. Il reste cependant quelques entités qui ont échangé lors de la première phase et diffusé loin de l'électrode. Le retour à l'équilibre est donc long à atteindre.

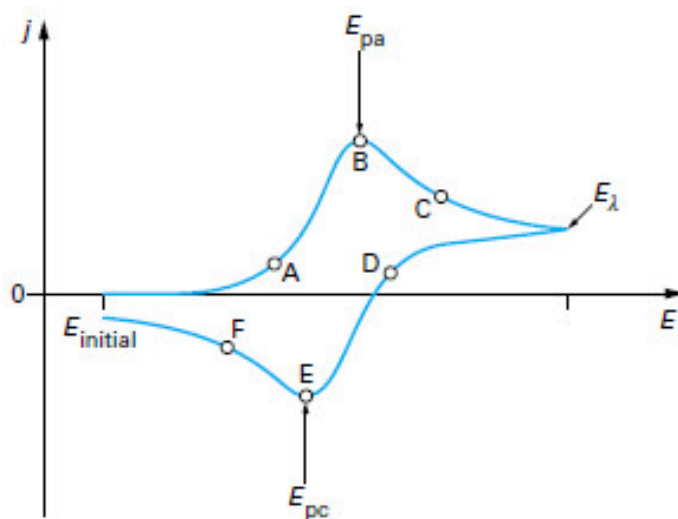


Figure 64 : Voltamogramme typique de voltamétrie cyclique.

Analyse d'un voltamogramme

Les informations accessibles sur un voltamogramme se trouvent dans les extremums ou pics. Ceux-ci sont théoriquement symétriques autour du potentiel redox. Cependant, il arrive que les échanges redox se produisent mieux dans un sens que dans l'autre, ce qui entraîne une dissymétrie. Le signal est dit réversible au sens thermodynamique lorsque toutes les espèces réduites peuvent être ré-oxydées (ou inversement) de manière contrôlée pour revenir à l'état initial [206].

Lors d'un échange idéal entre l'espèce en solution et l'électrode, la différence de potentiel entre les deux pics est de 56 mV. La valeur réelle de cet écart est supérieure ou égale à 56 mV et est fortement dépendante de l'interaction électrode/protéine. Si l'échange d'électrons entre l'électrode et les protéines est "lent", l'écart augmente avec la vitesse de balayage.

La densité de courant maximum j_{max} observée lors des pics est reliée à la vitesse de balayage v_b . Pour des espèces en solution la loi est la suivante [206]:

$$j_{max} = -0,446 \times [A] Na \frac{(nq)^{3/2}}{\sqrt{k_B T}} \sqrt{D} \sqrt{v_b} \quad \text{Eq 4}$$

Cette loi peut être vérifiée par l'exploitation de plusieurs voltamogrammes à des vitesses de balayage différentes. Elle permet de remonter au coefficient de diffusion de l'espèce redox. Cette loi n'est pas valable pour les espèces adsorbées à l'électrode. Dans ce cas, la densité de courant maximum est proportionnelle à la vitesse de balayage, et non à sa racine carrée.

1.1.2 Le montage expérimental

Le montage expérimental est composé de trois électrodes reliées à un potentiostat qui contrôle les mesures et les ajustements de tension et de courant. L'ensemble est dans une enceinte permettant d'effectuer l'expérience en anaérobie. L'électrode de travail est en carbone vitreux et son diamètre est 3,5 mm. Elle est renversée (face vers le haut) et sert de support à une goutte de 20 μ L contenant l'espèce redox à étudier. Une contre-électrode de platine et une microélectrode de référence plongent dans la goutte (Figure 65). L'électrode de référence est une électrode Ag/AgCl en KCl 3M avec un fritté de silice comme jonction avec la solution. Le potentiel de l'électrode de travail est ajusté par rapport à celui de l'électrode de référence. Le courant est mesuré entre l'électrode de travail et la contre-électrode.

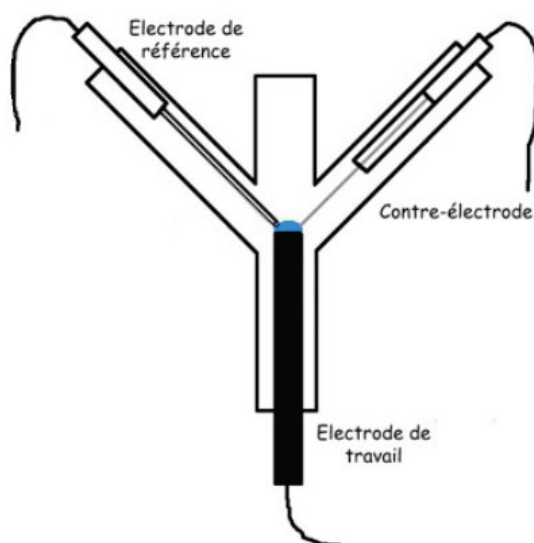


Figure 65 : Schéma du montage expérimental permettant de faire des expériences de voltamétrie cyclique.

1.1.3 Le traitement des données

L'essentiel des informations est extrait du relevé des pics d'oxydation I_{ox} et de réduction I_{red} . La ligne de base est soustraite des voltamogrammes avant d'effectuer le relevé. La soustraction est faite indépendamment sur chaque sens de balayage. La ligne de base est considérée comme linéaire le long d'un balayage. Elle est déterminée à partir du signal observé au début du balayage (Figure 66).

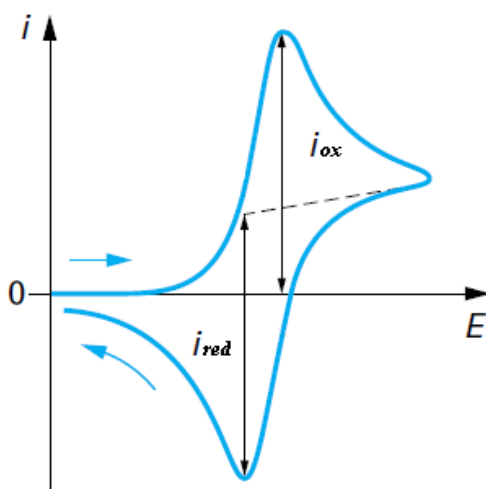


Figure 66: Mesure des courants de pics. Représentation de la ligne de base.

1.2 Les mesures entre électrodes

1.2.1 Le principe

Une mesure directe de conduction peut être réalisée à travers deux électrodes d'or déposées sur un ensemble de nanofils. Un échantillon contenant des fibres à haute densité est séché sur du silicium oxydé (couche d'oxyde de 500 nm). Le dépôt des électrodes est fait par évaporation d'or par canon à électrons directement sur l'échantillon (Figure 67).

Les protéines ne supportant pas les traitements chimiques nécessaires à la lithographie, un masque mécanique est utilisé pour définir le motif des électrodes. Le masque le plus simple est un fil fin. Cela permet de simplement diviser l'échantillon en deux grandes électrodes séparées par un gap égal au diamètre du fil. Ce diamètre peut être choisi entre 40 et 100 μm .

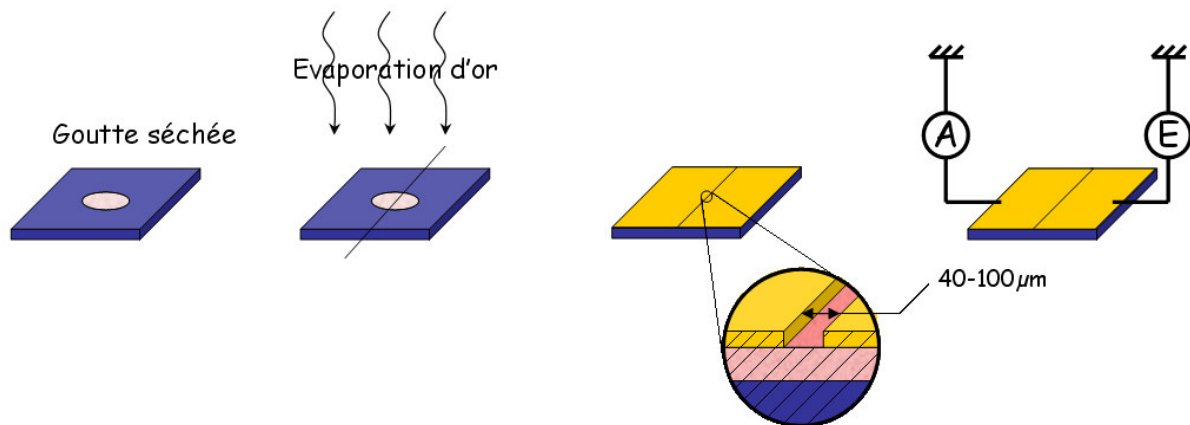


Figure 67 : Schéma de principe du dépôt d'électrodes sur un échantillon de protéines.

Les électrodes sont contactées sous pointe et les mesures tension/courant sont effectuées à l'aide d'un appareil Keithley 6410. Celui-ci est piloté par une interface labview permettant de contrôler les différents paramètres et d'effectuer des rampes de tension.

1.2.2 Les mesures à basse température

L'étude de la température sur la conductivité d'un échantillon permet de comprendre les mécanismes de conduction mis en jeu. L'hélium liquide est utilisé pour atteindre les températures nettement en dessous de 0 °C. L'échantillon est positionné dans une enceinte confinée possédant des pointes permettant de contacter les électrodes. Cette enceinte est mise sous vide avant que l'hélium soit injecté pour faire descendre la température. Celle-ci est ensuite régulée par un système de chauffage.

La mesure de la conductance σ peut-être représentée sur un graphique d'Arrhenius : $\ln(\sigma)=f(1/T)$. Ce type de représentation met en évidence les dépendances exponentielles décroissantes :

$$\sigma \propto e^{-\frac{\varepsilon}{k_B T}}$$

Eq 5

où ε représente une énergie intrinsèque au système.

Ce type d'évolution est retrouvé dans de nombreux conducteurs non-métalliques [207, 208].

1.3 Les mesures sur nanofils isolés

Plusieurs techniques permettent de mesurer le courant traversant des nanofils isolés [209-212]. Les plus courantes impliquent généralement une lithographie en présence des échantillons. Cela n'est pas possible avec les nanofils de protéines qui ne résisteraient pas aux traitements chimiques impliqués. Les deux techniques finalement utilisées sont le dépôt aléatoire sur réseau d'électrodes et l'AFM conducteur.

1.3.1 Le dépôt sur des réseaux d'électrodes

Des réseaux d'électrodes d'or ont été réalisés par lithographie UV ou électronique. Les différentes géométries de réseau réalisées sont montrées dans la Figure 68. La lithographie UV a permis de réaliser des peignes inter-digités d'électrodes de 1, 2, 5, 10 μm espacées respectivement des mêmes dimensions. La lithographie électronique a permis de réaliser des groupes de quatre électrodes de 85 nm de large espacées de 75 nm. Une goutte de solution contenant les nanofils est séchée à la surface d'un réseau. La concentration est ajustée de manière à ce que, statistiquement, une quantité de nanofil dénombrable traverse le gap entre les électrodes. Les électrodes peuvent ensuite être contactées avec des pointes pour faire des mesures tension/courant.

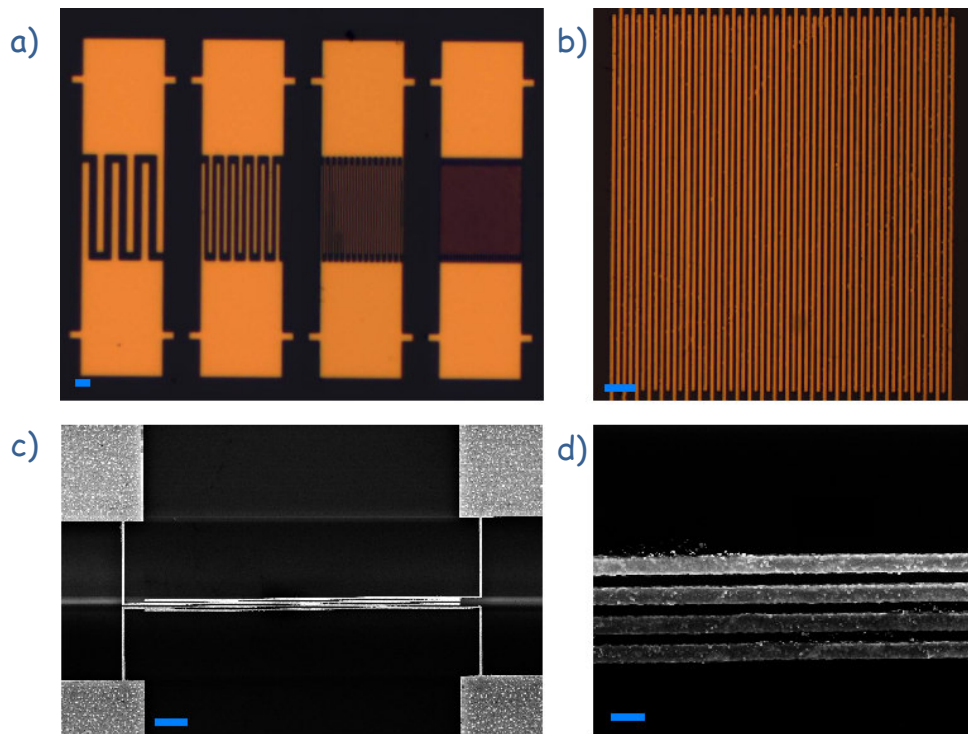


Figure 68 : Images des électrodes lithographiées. a-b) Microscopie optique d'électrodes interdigitées. Barre d'échelle 20 μm . c-d) MEB d'électrodes réalisées par e-beam. Barre d'échelle 2 μm et 200 nm.

1.3.2 L'AFM conducteur

Afin d'obtenir un meilleur contact entre le nanofil et l'électrode, il est préférable de venir déposer les électrodes au-dessus de l'objet. Cependant, il n'est pas possible de réaliser une lithographie en présence des protéines. Il est possible d'effectuer un dépôt d'or avec masque mécanique sur une partie de l'échantillon. En bordure de ce dépôt (qui constitue une électrode), il y a alors des nanofils qui sont partiellement recouverts. La partie non-recouverte peut être contactée par une pointe AFM conductrice (Figure 69). L'avantage de l'AFM pour ce genre de mesure est qu'il effectue une cartographie de la mesure de courant en même temps qu'un relevé topographique. Les deux cartes peuvent être comparées pour vérifier que les zones conductrices correspondent bien aux objets étudiés. Différents modes d'utilisation existent pour l'AFM conducteur. Ils seront présentés en même temps que les résultats.

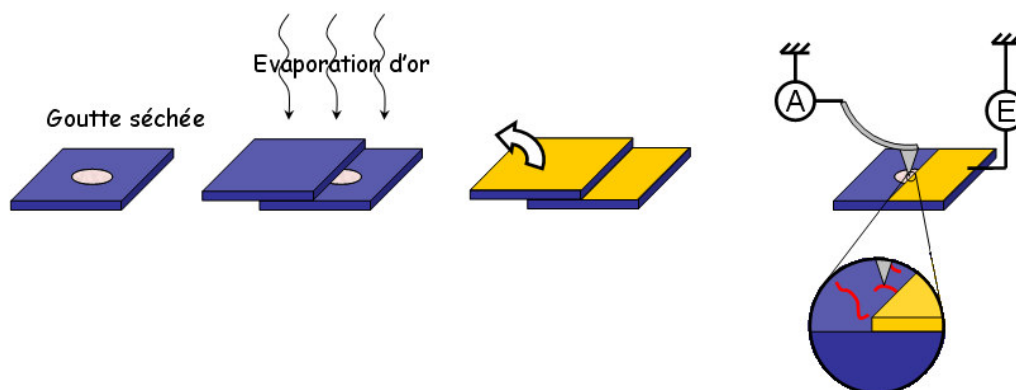


Figure 69 : Principe de la mesure en AFM conducteur

2 Les résultats

2.1 La caractérisation par voltamétrie cyclique

2.1.1 La rubrédoxine

Premières observations

Les voltammogrammes réalisés sur la rubrédoxine seule en solution présentent un couple redox pour un potentiel de -110 mV ; ce qui correspond aux observations faites lors de la titration redox. Le signal est symétrique, ce qui correspond à un transfert électronique à priori réversible et efficace entre la rubrédoxine et l'électrode (Figure 70).

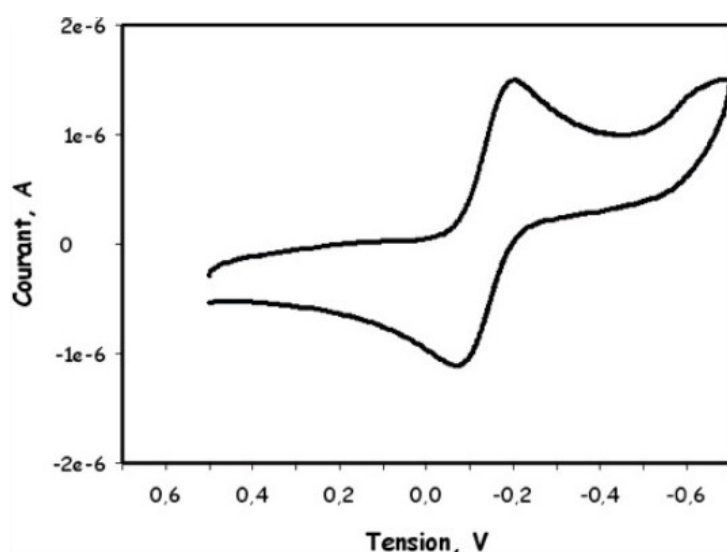


Figure 70 : Voltammogramme de la rubrédoxine réalisée pour une vitesse de balayage de 30 mV/s

La vitesse de balayage

L'évolution des pics montre que leur écart diminue avec la vitesse de balayage v_b . Cet écart est de 150 mV pour une vitesse de 30 mV/s au lieu des 56 mV attendus pour un système idéal. Le courant du pic de réduction augmente proportionnellement à la racine carrée de v_b (Figure 71). Cela est cohérent avec l'équation Eq 4 :

$$j_{\max} = -0,446 \times [A]Na \frac{(nq)^{3/2}}{\sqrt{k_B T}} \sqrt{D} \sqrt{v_b}$$

qui définit le courant attendu pour une espèce diffusant en solution. Une régression linéaire sur la Figure 71 permet d'extraire une pente. Sachant que la concentration en protéine utilisée pour les expériences est de 330 $\mu\text{mol/L}$, cette pente permet de remonter à un coefficient de diffusion de $1,25 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$. Cette valeur est standard pour une protéine globulaire de faible poids moléculaire [213, 214].

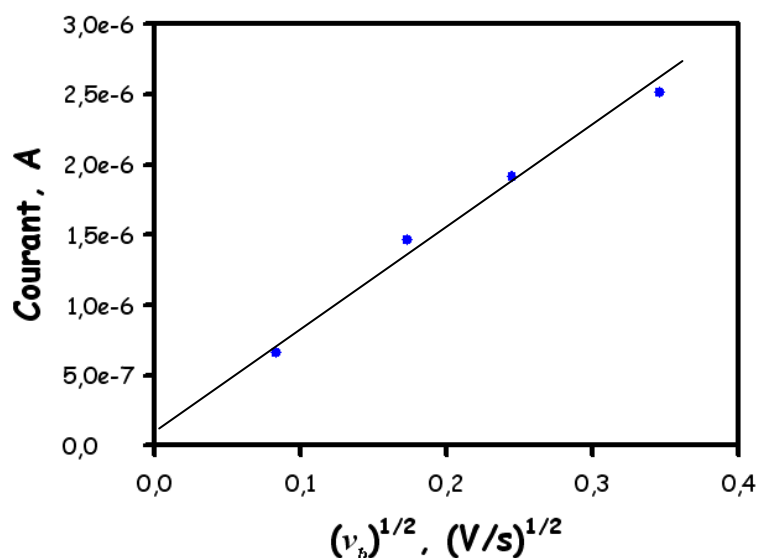


Figure 71 : Evolution du courant relevé au pic de réduction pour différentes vitesses de balayage.

Tout indique que la protéine effectue un transfert réversible avec l'électrode. Mais ce transfert est lent car un écart supérieur à 56 mV est observé entre les pics. Cela signifie que la protéine doit être en contact un certain temps avec l'électrode pour échanger des électrons. Cet aspect est sans grande incidence pour la finalité du projet qui vise à utiliser des objets immobilisés.

L'état de surface

Le courant mesuré sur un pic possède une variabilité pouvant atteindre 30 % d'une expérience à l'autre. Cette dispersion est directement liée à l'état de surface de l'électrode. Celui-ci est primordial pour avoir de bonnes interactions, et donc de bons échanges d'électrons entre les protéines et l'électrode. Cet état de surface a tendance à se dégrader au cours du temps. Il est possible que des protéines s'adsorbent à la surface de l'électrode et la bloquent. Cela empêche alors les autres protéines de venir échanger à leur tour. L'état de surface peut-être restauré en nettoyant et polissant l'électrode. Des traitements peuvent également être effectués par l'adsorption de molécules ou de peptides à la surface de l'électrode. Cela va modifier les charges de surface de l'électrode et donc modifier ses interactions avec les protéines.

2.1.2 La protéine chimère

Une différence expérimentale primordiale

Par rapport à la rubrédoxine, l'étude de la protéine chimère par voltamétrie cyclique présente une différence notable. Lorsque la protéine chimère est dans l'acide acétique, elle est soluble et diffuse comme la rubrédoxine seule en solution (avec un coefficient de diffusion qui peut être légèrement différent). Par contre, après polymérisation, les fibres amyloïdes sont insolubles et sédimentent à la surface de l'électrode.

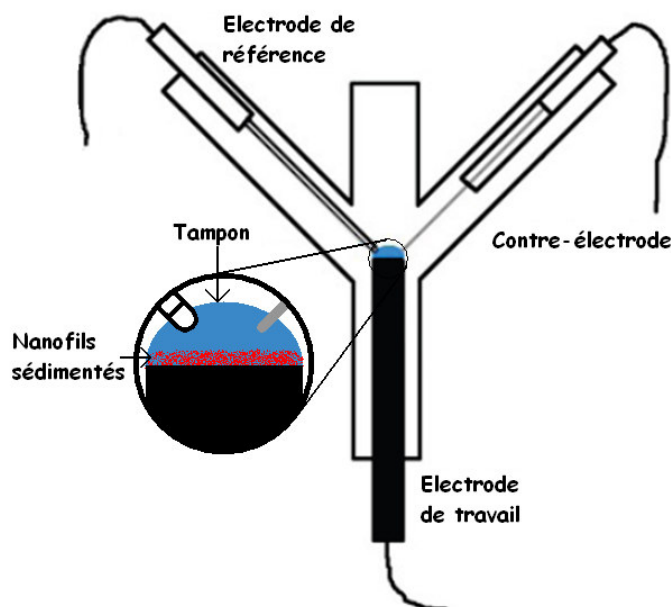


Figure 72 : Schéma de l'expérience de voltamétrie cyclique sur des nanofils.

Les voltamogrammes attendus sont alors différents car il n'y a pas de diffusion des espèces jusqu'à l'électrode. Afin de maîtriser l'échantillon, l'expérience est préparée différemment. Les nanofils sont centrifugés afin d'en retirer la fraction soluble (monomères éventuels), et séchés sur l'électrode afin de s'assurer de leur sédimentation. Le contact aqueux avec l'électrode de référence et la contre-électrode est réalisé par une goutte de tampon à la place de l'échantillon (Figure 72).

Un deuxième couple redox

Les voltamogrammes de la protéine chimère Rd-het sont différents de ceux de la rubrédoxine seule (Figure 73). Ils présentent deux couples redox : un vers -110 mV et l'autre vers 230 mV. Le premier correspond à la transition FeIII/FeII observée pour la rubrédoxine seule alors que le deuxième n'était pas présent. Aucune autre espèce redox n'a été introduite et il paraît peu probable que la rubrédoxine effectue une transition FeIV/FeIII en plus. Cette deuxième transition redox est attribuée à une deuxième population de rubrédoxine. Celles-ci subiraient des contraintes à cause de la formation des fibres amyloïdes. Ces contraintes peuvent alors légèrement modifier la structure de la protéine et la liaison de l'atome de fer. Ce métal échange alors son électron pour un niveau d'énergie différent, c'est-à-dire pour un potentiel différent.

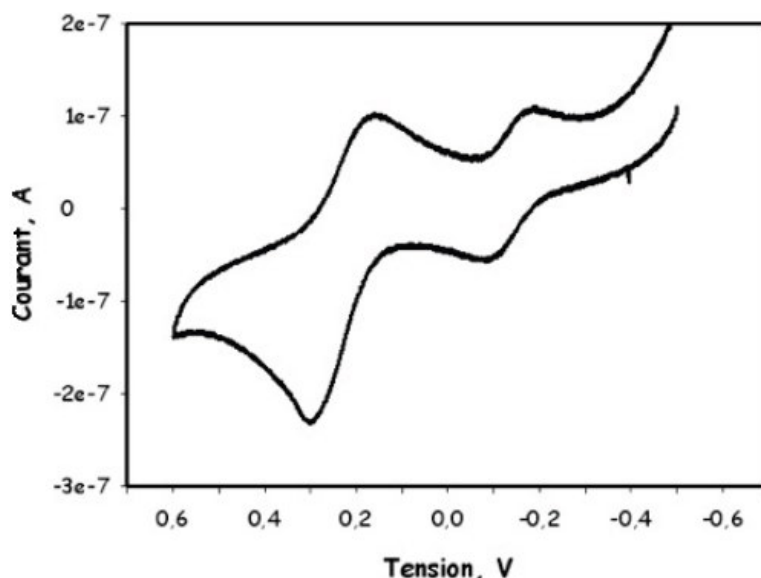


Figure 73 : Voltamogramme des nanofils de Rd-het sédimentés sur l'électrode de travail pour une vitesse de balayage de 3 mV/s.

La présence de cette deuxième population de rubrédoxine n'est pas un obstacle à la réalisation d'un nanofil conducteur d'électricité. Elle est cependant révélatrice de contraintes exercées sur la rubrédoxine y compris au niveau de son centre fer.

La vitesse de balayage

Le relevé des différents pics des deux couples est réalisé pour différentes vitesses de balayage v_b (Figure 74). Une variation du courant proportionnellement à v_b est attendue car il s'agit d'objets adsorbés à la surface de l'électrode. Cependant, le courant des différents pics varie avec la racine carrée de v_b comme dans le cas d'un système diffusif (protéines libres en solution). La concentration en protéines proche de l'électrode de travail n'est pas connue. Il n'est donc pas possible de remonter à un coefficient de diffusion effectif en utilisant l'équation Eq 4. Le phénomène de sédimentation implique cependant une concentration fortement élevée qui va dans le sens d'un coefficient de diffusion plutôt faible.

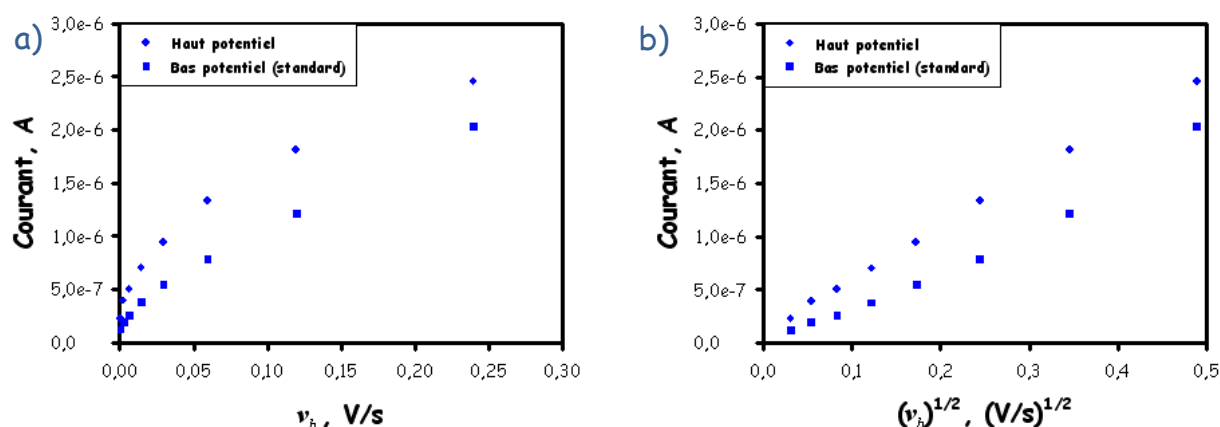


Figure 74 : Courant relevé sur les deux pics de réduction issus des voltamogrammes des nanofils. a) Courant en fonction de la vitesse de balayage. b) Courant en fonction de la racine carrée de la vitesse de balayage.

La diffusion des électrons

L'hypothèse avancée pour expliquer ce phénomène diffusif est que ce ne sont pas les protéines qui diffusent en solution, mais les électrons qui diffusent le long des nanofils. La diffusion des électrons n'est, à priori, pas régie par les lois de Fick car les particules ne se déplacent pas dans un milieu continu. Il y a ici une sorte de matrice 3D (l'agrégat de nanofils) dont les atomes de fer représentent des lieux accessibles pour les électrons. Un électron peut se déplacer librement d'un

atome de fer II à un atome de fer III à condition qu'il dispose de l'énergie suffisante pour passer la barrière entre les atomes métalliques. Ce modèle permet une certaine marche aléatoire des électrons, compatible avec une diffusion selon les lois de Fick. Le coefficient de diffusion équivalent est alors relié au rapport entre l'énergie de l'électron et la hauteur de la barrière à traverser.

Cette expérience est une preuve indirecte de la conduction des nanofils car elle démontre que les électrons peuvent passer d'une rubrédoxine à une autre le long des nanofils.

2.2 Les mesures entre électrodes

Des électrodes d'or ont été déposées sur différents types d'échantillons protéiques. Une mesure tension/courant est d'abord effectuée à température ambiante. Si elle donne lieu à une mesure de conduction, une mesure à basse température est envisagée.

2.2.1 Les mesures à température ambiante

Parmi tous les échantillons protéiques testés, seuls les nanofils organisés sous forme de gel conduisent. Aucun courant n'a pu être mesuré non plus sur des fibres amyloïdes seules (gel ou pas) ou des rubrédoxines seules. Les échantillons conduisant le courant présentent un caractère ohmique (Figure 75). C'est-à-dire un courant proportionnel à la différence de potentiel appliquée.

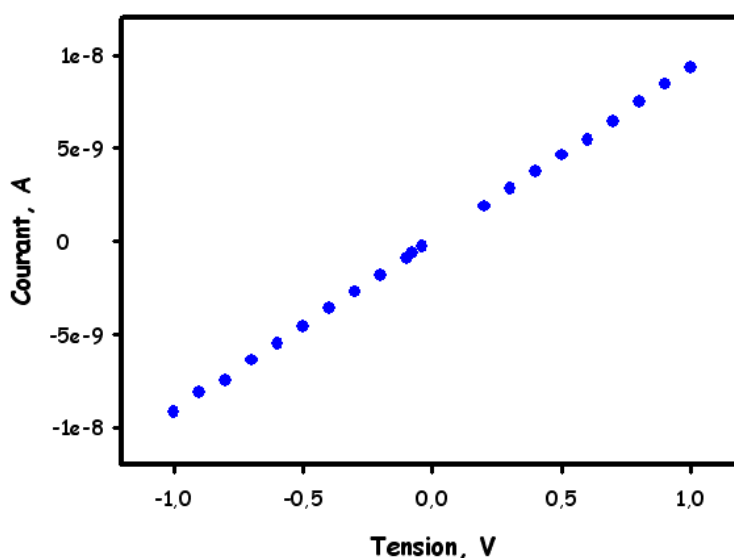


Figure 75 : Courbe tension-courant typique correspondant à une résistance de 100 MΩ.

La résistance correspondante varie selon les échantillons de 100 kΩ à 100 MΩ. Plusieurs hypothèses peuvent être formulées pour expliquer cette dispersion mais aucune n'a pu être

vérifiée expérimentalement. Tout d'abord, la géométrie de l'échantillon impacte la résistance. La largeur du gap est une donnée à priori reproductible (diamètre du fil servant de masque) mais la section de matériau conducteur (surface de coupe de la goutte séchée) peut être variable. L'épaisseur notamment, est une donnée qui n'est ni estimable, ni mesurable. La structure gel est importante mais son impact réel n'est pas connu. Une faible variation dans l'organisation des protéines peut induire des grands changements dans la conduction. Il n'est pas non plus possible de savoir si la conduction est homogène dans l'échantillon ou s'il elle résulte de quelques nanofils permettant au courant de passer d'une électrode à l'autre. Dans ce deuxième cas, le nombre de nanofils réellement conducteurs peut être différent d'un échantillon à l'autre et entraîner une grande variation de la résistance. Les résistances de contact entre l'échantillon et le dépôt d'or peuvent également être variables.

2.2.2 L'évolution des échantillons dans le temps

La résistance de chaque échantillon a été mesurée au cours du temps (sur une échelle de plusieurs jours) pour estimer sa dégradation. Entre deux mesures, les échantillons ont été conservés à température ambiante. La résistance augmente avec le temps mais semble stabilisée après 15 jours (Figure 76). Au bout d'un temps variant de quelques jours à plusieurs semaines, elle devient brutalement infinie ; c'est-à-dire qu'il n'y a plus de conduction de l'échantillon en question.

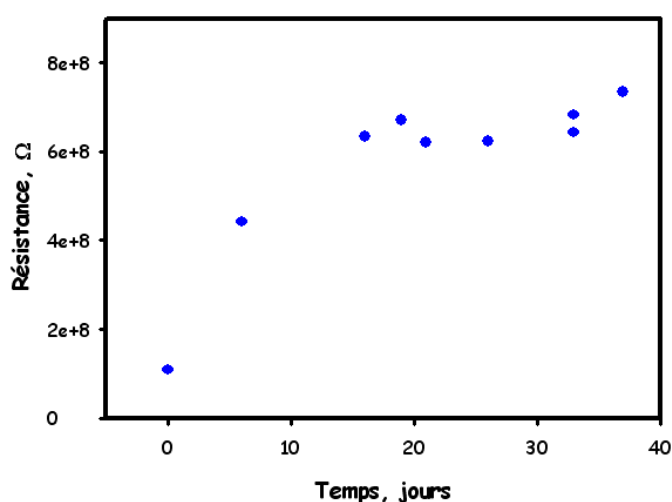


Figure 76 : Evolution au cours du temps de la résistance de l'échantillon ayant eu la plus grande longévité.

Il semble donc que la durée de vie de ce matériau conducteur est limitée. Cela n'est pas très surprenant dans la mesure où il s'agit d'échantillons biologiques et qu'ils ont été conservés à l'air et à température ambiante. Cette dégradation attendue possède une implication forte sur les potentielles applications de ce type d'objet. Il n'est cependant pas impossible de pouvoir améliorer ce temps de dégradation par des traitements d'enrobage.

2.2.3 L'influence de la température

Le mode de conduction dans un échantillon peut être étudié à travers l'influence de la température. La Figure 77 montre l'évolution de la conductance en fonction de l'inverse de la température. Pour une température inférieure à 0 °C (273 °K), les molécules d'eau piégées à l'intérieur des protéines sont figées. Les ions ne sont plus mobiles et ne peuvent donc plus être à l'origine d'une conduction ionique à travers l'échantillon. Ce n'est donc pas ce mode de conduction qui a lieu dans les nanofils.

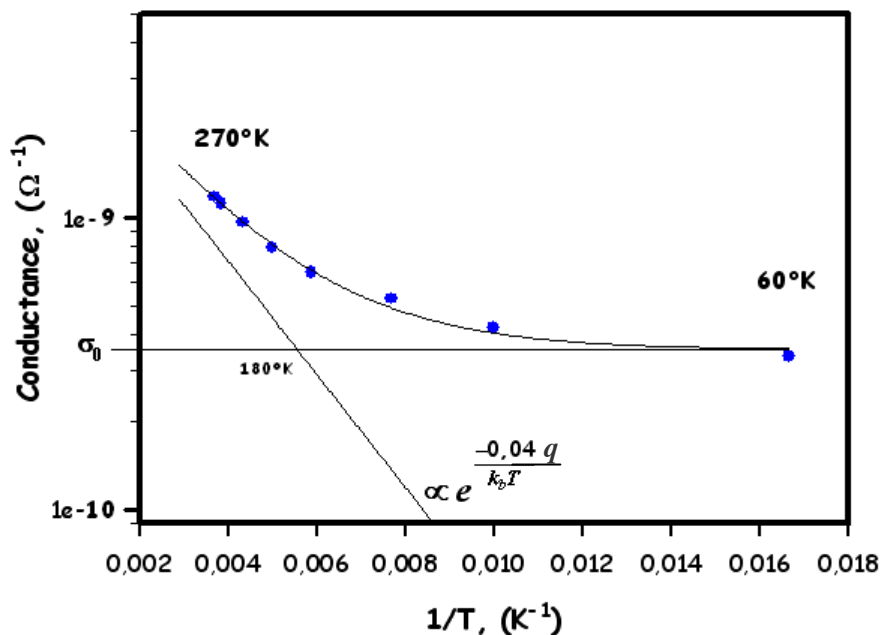


Figure 77 : Evolution de la résistance d'un échantillon en fonction de la température. La fonction ajustée ainsi que ses deux composantes sont également représentées.

La courbe expérimentale correspond à une décroissance exponentielle du type

$$\sigma_0 + a.e^{\frac{-E_a}{kT}}$$

où σ_0 correspond à une conductivité résiduelle

a est relié aux paramètres géométriques du système

E_a est une énergie d'activation

Cette fonction est la somme de deux composantes : une constante et une exponentielle décroissante. Cela met en évidence l'existence de deux modes de conduction dans les protéines. L'un est dépendant de la température et l'autre non. Cela a déjà été observé pour le transfert d'électrons dans les protéines et est cohérent avec un transport par effet tunnel [215]. L'ajustement de la fonction avec la courbe expérimentale permet d'extraire une énergie d'activation E_a de 40 meV. Cela correspond à une température de 460 °K. Ce niveau d'énergie est assez faible par rapport à l'énergie d'activation des polymères conducteurs qui est généralement comprise entre 0,1 et 1 eV [208, 216]. Le silicium possède une énergie d'activation supérieure à 1 eV. Il semble donc que les rubrédoxines sont suffisamment proches les unes des autres pour échanger correctement leurs électrons.

Les deux modes de conduction sont parallèles. La constante est dominante à faible température alors que l'exponentielle décroissante l'est à température plus élevée. Les deux courbes se croisent pour une valeur charnière de 180 °K.

Cette zone de température est également connue pour impacter la dynamique des protéines [217]. Entre 150 et 200 °K, cette dynamique subit une rupture et augmente plus rapidement avec la température. Il est possible que cette transition soit liée à la transition entre les deux modes de transfert électronique. A faible température, il n'y a pas ou peu de mouvement de protéines. Seul un transfert ne nécessitant pas d'apport d'énergie est possible entre deux centres redox. A partir de la température critique de 180 °K, les protéines se mettent à bouger, ce qui confère de l'énergie thermique aux électrons. Ils peuvent alors utiliser cette énergie pour effectuer des sauts. Il est important de noter que la conduction observée correspond à un ensemble de nanofils. Les résistances de contact, les transferts d'un fil à l'autre et le nombre de fils effectivement conducteurs vont fortement impacter les caractéristiques de conduction de ces gels. Il est donc difficile de tirer des conclusions sur les propriétés de conduction réelles des nanofils.

2.3 Les mesures sur nanofil isolé

Effectuer la mesure sur des nanofils isolés est primordial pour mesurer le potentiel réel de ces objets. Plusieurs techniques ont été mises en œuvre pour venir contacter ces objets nanométriques.

2.3.1 Le dépôt aléatoire sur un réseau d'électrodes

Réseaux inter-digités

Différents réseaux d'électrodes ont été réalisés par lithographie. La lithographie UV a permis de réaliser des réseaux d'électrodes inter-digitées avec des pas de 1, 2, 5 ou 10 μm . Des mesures de courant ont pu être réalisées sur différents échantillons (Figure 78). Il s'agit de courants ohmiques correspondant à des résistances comprises entre 1 et 100 $\text{M}\Omega$. Tout semble indiquer que des ensembles de nanofils sont à l'origine de ces mesures et non des fils isolés. Ces ensembles sont systématiquement présents lorsqu'un courant est mesuré. De plus, des ensembles de fibres amyloïdes de Het-s 218-289 peuvent également donner lieu à ce type de mesure.

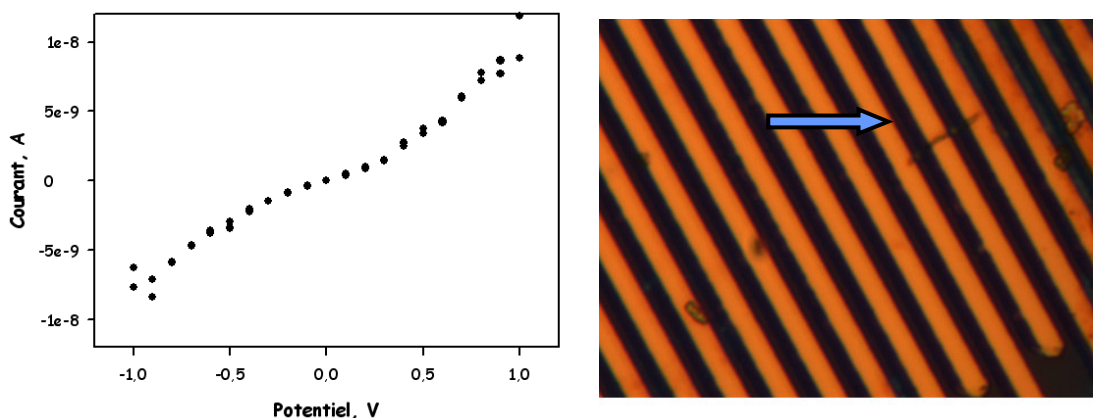


Figure 78 : Mesure tension/courant sur un ensemble de nanofils sur un réseau d'électrodes de 2 μm .

Tous ces résultats expérimentaux sont cohérents avec d'autres résultats publiés [152]. Ces travaux traitent de mesures de conductance similaires sur des ensembles de fibres issues de peptides. Il a également été mis en évidence que cette conduction est ionique et provient des molécules d'eau et des ions emprisonnés entre les fibres. Cela explique pourquoi les échantillons

de fibres seules conduisent autant que ceux avec la rubrédoxine. Ce n'est donc pas un résultat pertinent pour l'avancement du projet.

Électrodes nanométriques

Des groupes de quatre électrodes ont été réalisés par lithographie électronique. Ces électrodes d'or font 85 nm de large et sont séparées d'un gap de 75 nm. Une goutte contenant des nanofils est séchée par-dessus les électrodes et une image AFM est réalisée.

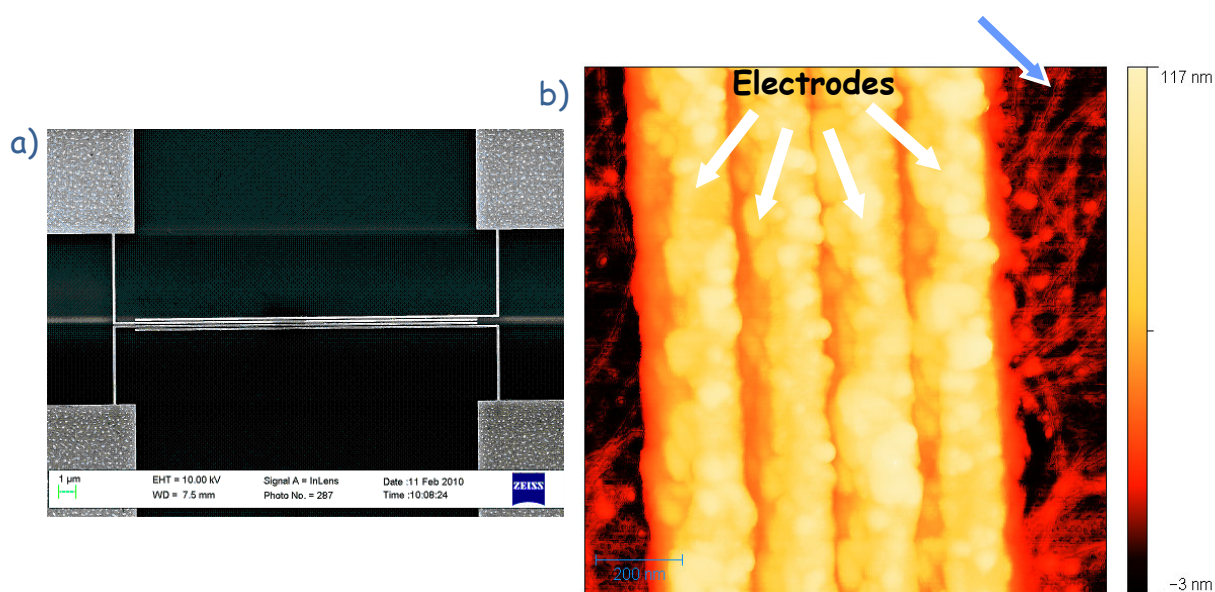


Figure 79 : a) image MEB des électrodes. b) image AFM des électrodes après dépôt de nanofils. Un des nanofils est montré par la flèche bleue.

L'image AFM présentée en Figure 79 b) montre les quatre électrodes verticalement, et des nanofils sur le substrat autour des électrodes. Il n'est cependant pas possible d'affirmer que des nanofils sont connectés à deux électrodes. La forte rugosité de l'or sur ces échantillons ne permet pas d'imager les éventuels nanofils sur les électrodes. De plus, il est possible que les nanofils se répartissent préférentiellement autour des électrodes à cause de leur épaisseur de 100 nm. En effet, lorsque la goutte contenant l'échantillon sèche, elle découvre en priorité les électrodes et emporte les nanofils vers les points bas.

Des mesures tension/courant sur ces électrodes ont parfois donné lieu à la mesure d'une résistance dans le cas d'ensembles de nanofils. Ces résultats sont semblables à ceux présentés pour les réseaux inter-digités.

2.3.2 Les mesures en AFM conducteur

Réalisation des échantillons

La première difficulté à surmonter pour effectuer de l'AFM conducteur est d'obtenir un échantillon exploitable. C'est-à-dire un échantillon sur lequel il y a des nanofils dont une extrémité est recouverte par l'électrode et l'autre est dégagée. Cela implique que le bord de l'électrode soit suffisamment franc, ce qui est délicat à obtenir avec un masque mécanique.

Pour obtenir le bord le plus franc, il faut que le masque soit le plus proche de la surface possible. S'il y a une zone de vide entre le masque et la surface (ce qui est facilement le cas avec un masque mal plaqué), l'or se dépose également sous le masque. Cela résulte en une transition douce entre la zone bien couverte par le masque et la zone totalement découverte (Figure 80 a). Le meilleur masque est un wafer de silicium dont le bord est biseauté (Figure 80 b). La très faible rugosité du silicium permet un bon contact avec l'échantillon et le biseau permet d'obtenir un bord bien délimité.

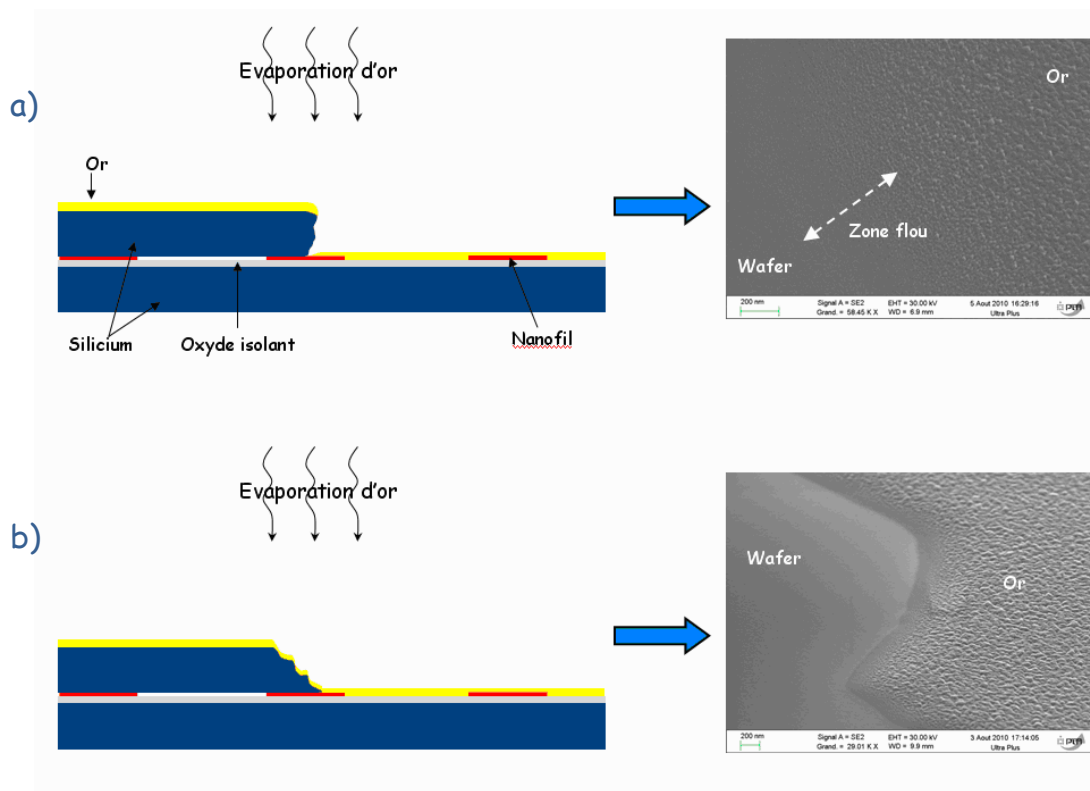


Figure 80 : Mise en évidence de l'importance du biseau pour obtenir une frontière marquée au bord de l'électrode. a) Un masque mal réalisé permet à l'or de s'engouffrer dans son ombre. b) Un masque bien réalisé permet un bord d'électrode franc.

La densité de nanofils doit aussi être adaptée. Il faut qu'ils soient suffisamment nombreux pour être trouvés facilement. Mais s'ils recouvrent totalement la surface, il n'est plus possible de les distinguer. De plus, lorsque la goutte sèche, elle dépose les nanofils de manière inhomogène sur l'échantillon. Les nanofils sont plus nombreux vers l'extérieur du cercle défini par la goutte. La concentration permettant d'avoir une répartition idéale de nanofils se situe autour de $0,1-1 \mu\text{M}$ de monomère avant formation des fibres. La Figure 81 présente une image AFM d'un échantillon exploitable. Plusieurs nanofils peuvent être identifiés. Certains d'entre eux ont une extrémité sous l'électrode. Ils sont donc de bons candidats pour que leur conductance soit mesurée entre l'électrode et la pointe AFM.

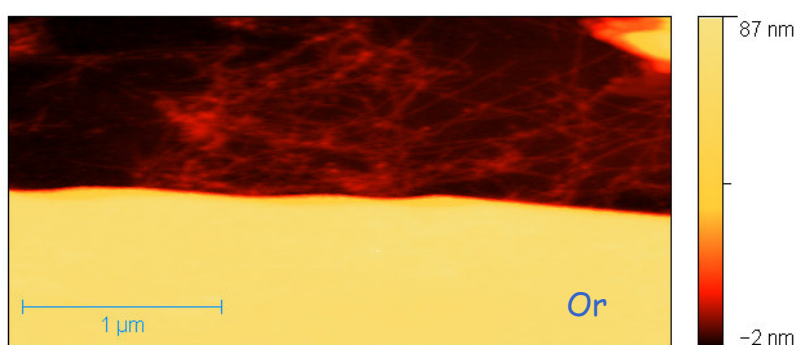


Figure 81 : Image AFM en mode tapping représentant des nanofils contactés d'un côté par l'électrode et pouvant être contactée par la pointe AFM de l'autre côté.

Les différents modes d'AFM conducteur

L'AFM peut s'utiliser de différentes manières. Cela est également valable pour l'AFM conducteur. La mise en pratique de chacun de ces modes présente des difficultés.

Le mode “tapping” permet d'imager les nanofils et de les localiser sur un substrat (Figure 81). Cependant, le contact entre la pointe et les nanofils est intermittent, ce qui ne permet pas une réelle mesure de courant.

Le mode “contact” utilise un contact permanent entre la pointe et la surface. Mais la force qu'exerce la pointe sur les objets a tendance à les déplacer au lieu d'épouser leur forme. Il est alors impossible de les imager, de les localiser et de les contacter.

Il existe d'autres techniques intermédiaires entre les deux modes. L'une d'entre elles utilise la fonction “point & shoot” et se réalise en deux temps. Une image est réalisée en mode tapping. Ensuite, la pointe est appliquée en un point spécifique d'un objet grâce à la fonction “point &

shoot''. La pointe possède alors un contact bien établi avec l'objet et une mesure de courant peut être effectuée à partir de ce point. Cette technique ne permet pas de faire une cartographie en courant car celui-ci n'est mesuré qu'en un point. Concrètement, il est délicat de venir appliquer la pointe précisément sur un nanofil de 8 nm de diamètre. Il y a une dérive de l'échantillon entre le moment de l'image et l'utilisation de la fonction permettant le contact. Il peut également arriver que les objets glissent sous la pointe.

Une autre technique alterne des phases "tapping" et "contact" sur des laps de temps très courts afin de permettre une imagerie durant la phase tapping et une mesure de courant durant la phase contact [218]. Il n'y a pas de dispositif commercial de cette technique. Sa mise en œuvre nécessite donc un travail de développement qui n'a pu être effectué durant cette thèse faute de temps.

Bien que l'AFM soit un outil puissant pour faire des mesures de conduction locale, la mise en application des différentes techniques est délicate sur les objets mous. Un temps de développement plus long est nécessaire pour obtenir des résultats.

Conclusion et perspectives

L'objectif de ce travail de thèse a été de réaliser un nanofil conducteur d'électricité constitué uniquement de protéines. L'enjeu est de montrer qu'il est possible de réaliser des objets technologiques en exploitant uniquement les fonctionnalités des protéines ; c'est-à-dire sans aucun procédé chimique ou technologique. Ce type de réalisation ouvre la voie à de nouveaux objets dans lesquels les protéines assurent l'essentiel des fonctionnalités. Exploiter au mieux ces molécules d'origine biologique permettrait de relever de nombreux défis tels que la miniaturisation à l'échelle moléculaire ou le respect de la vie et de l'environnement.

Le nanofil en question est basé sur l'auto-assemblage des fibres amyloïdes et sur la fonction de transfert d'électrons d'une métalloprotéine. Deux protéines possédant ces fonctions peuvent être liées par une liaison peptidique (qui est une liaison covalente) en une seule protéine. Cette protéine "chimère" possède alors les deux fonctions, ce qui aboutit à un objet nouveau. L'un des domaines va former des fibres amyloïdes par auto-assemblage. Cette structure protéique expose à sa surface le deuxième domaine qui peut alors transférer les électrons d'une extrémité à l'autre de la fibre par sauts successifs.

Le domaine formant des fibres amyloïdes provient de la protéine het-s. Cette protéine est naturellement composée de deux domaines. Le premier est une fonction de reconnaissance qui n'est efficace que lorsqu'elle est exposée à la surface des fibres amyloïdes formées par le deuxième domaine [153]. C'est ce deuxième domaine, situé entre les résidus 218 et 289, qui nous intéresse dans le cadre du projet. Ce domaine a été séparé de la fonction de reconnaissance et étudié [126, 153, 156]. Dans le cadre de cette thèse, une rubrédoxine a été mise à la place du domaine de reconnaissance. Cette petite protéine possède un centre fer capable de changer d'état redox et ainsi de transférer les électrons [182].

La protéine chimère a été produite en tant que protéine recombinante. Les séquences ADN codant pour les deux protéines ont été fusionnées et introduites dans un plasmide, lui-même introduit dans des bactéries *E. Coli* qui vont produire la protéine. Les bactéries sont cultivées et la production de la protéine déclenchée. A la fin de la culture, les bactéries ont produit une protéine dont le poids moléculaire correspond à celui attendu pour la protéine chimère. La réalisation d'une chaîne polypeptidique associant une séquence capable de former des fibres

amyloïdes et une séquence capable de former une rubrédoxine, était une première étape. Il a fallu ensuite la purifier et vérifier que cette chaîne polypeptidique était capable de former deux domaines distincts capables d'effectuer les mêmes fonctions que les protéines d'origine.

La purification de la protéine chimère a nécessité la mise au point d'un protocole particulier en raison des contraintes inhérentes au projet. Premièrement, la protéine est capable de former des fibres amyloïdes qui sont incompatibles avec la purification sur colonne de chromatographie. Il est donc indispensable de dénaturer le domaine formant des fibres amyloïdes. Deuxièmement, il est important de conserver le domaine rubrédoxine dans son état natif pour qu'il soit opérationnel une fois les fibres amyloïdes formées. Afin de prendre en compte ces différentes contraintes, la lyse des bactéries est effectuée directement en milieu dénaturant (urée 8 M), ce qui inhibe au plus tôt la formation des fibres amyloïdes. Grâce à son extraordinaire stabilité, le domaine rubrédoxine reste replié et possède toujours son centre fer dans ces conditions. La purification s'effectue par chromatographie d'affinité avec un métal, ce qui permet d'isoler les protéines des autres constituants des bactéries en une seule étape. En fin de purification, les protéines sont mises en acide acétique ce qui permet leur stockage sous forme monomérique et permet de déclencher la polymérisation des fibres amyloïdes par un simple ajustement du pH (de 2,7 en acide acétique à 5 ou 8 selon les conditions finales). Ce protocole permet d'extraire 2 à 4 mg de protéines pour un litre de culture de bactéries. La pureté des protéines n'est pas excellente (rarement supérieure à 50 %).

Un autre protocole qui se déroule entièrement en acide acétique (y compris la lyse) a été mis au point. Le rendement et la pureté sont nettement meilleurs mais les protéines ainsi produites ne sont pas capables de former des fibres amyloïdes. Il semble qu'une partie de ces protéines est dans un état conformationnel qui détériore la fonction fibrillaire. Ces protéines n'ont donc pas pu être utilisées dans le cadre de cette thèse. Un travail supplémentaire est nécessaire pour restaurer la fonction fibrillaire, soit en jouant sur différentes conditions physico-chimiques, soit en dénaturant complètement la protéine (y compris le domaine rubrédoxine) et en la repliant. Cette deuxième option implique cependant une renaturation du domaine rubrédoxine ainsi qu'une reconstitution de son centre fer, ce qui peut s'avérer délicat.

La formation des fibres amyloïdes a été caractérisée par diffusion de lumière et microscopie électronique. La diffusion de lumière permet de faire une cinétique qui se révèle très proche de celle de la protéine originale. On observe une formation rapide des fibres (en moins d'une heure)

suivie d'une agrégation entraînant une sédimentation. Ce type de mesure permet de s'assurer de la bonne formation des fibres amyloïdes et pourrait apporter de nombreux autres éléments dans le cadre d'études approfondies avec un appareil dédié à la diffusion de lumière [200, 214]. La microscopie électronique permet d'obtenir des informations sur la morphologie des fibres amyloïdes [130]. Celles-ci font de 200 nm à 2 μ m de long, ont un diamètre de 8 nm, et sont constituées de trois protofibrilles enroulées. Cependant, il existe une grande variabilité de la longueur des fibres ainsi que sur la manière dont elles s'agrègent les unes aux autres. Des études plus systématiques des échantillons et un criblage plus complet des différentes conditions physico-chimiques pourraient permettre de maîtriser un peu mieux ces différents paramètres, et ainsi de contrôler leur morphologie.

Une fois que les fibres amyloïdes sont formées, il faut vérifier que les rubrédoxines présentes à leur surface sont toujours repliées et capables d'assurer leur fonction de transfert d'électrons. Différentes techniques biophysiques existent pour caractériser le centre fer de la protéine [182, 184]. La quantité de fer dans les échantillons a été déterminée par spectrométrie de masse. La quantité de protéines étant mal connue sur les nanofils (la diffusion des fibres empêche un dosage par absorbance), la concordance entre la quantité de fer et celle de protéine n'est sûre qu'à 90%. Le centre fer de la protéine a également été caractérisé par spectroscopie d'absorbance et par résonance paramagnétique électronique. La liaison de l'atome de fer par les quatre cystéines de la rubrédoxine induit des raies d'absorbance caractéristiques qui se retrouvent dans la protéine chimère avant et après formation des fibres amyloïdes. La même concordance est observée en résonance paramagnétique électronique, ce qui atteste d'une bonne coordination des atomes de fer dans les rubrédoxines à la surface des fibres amyloïdes. Enfin, la titration redox des protéines permet de s'assurer que les rubrédoxines sont bien capables d'échanger leurs électrons. Les paramètres de titration montrent que le potentiel redox de la rubrédoxine seule est plus élevé que celui de la protéine chimère. Cependant, cette légère différence n'est pas un obstacle au bon déroulement des transferts d'électrons d'un bout à l'autre de la fibre.

Il a donc été montré qu'il est possible de former un nanofil de protéine, basé sur l'auto-assemblage d'une fibre amyloïde, qui expose à sa surface des rubrédoxines capables de transférer des électrons. La deuxième partie de ce travail de thèse a donc consisté à démontrer que ces rubrédoxines peuvent échanger des électrons les unes avec les autres et ainsi transporter ces électrons d'un bout à l'autre de la fibre.

La voltamétrie cyclique a permis de mettre en évidence la capacité des rubrédoxines à échanger leurs électrons, ce qui est une preuve indirecte de la capacité des nanofils à conduire le courant. Premièrement, ces expériences de voltamétrie cyclique ont montré l'existence d'une deuxième population de rubrédoxines lorsque les fibres amyloïdes sont formées. Les contraintes stériques appliquées aux métalloprotéines peuvent distordre leur centre fer et ainsi modifier le potentiel redox. Cela n'est pas rédhibitoire pour un transfert électronique entre protéines et montre que les rubrédoxines sont proches les unes des autres. Deuxièmement, l'étude en fonction de la vitesse de balayage révèle un caractère diffusif comme cela est observé sur des protéines en solution alors que les nanofils sont sédimentés. L'explication à ce phénomène est que les électrons peuvent se déplacer le long des nanofils selon un mode similaire à de la diffusion. Il n'est malheureusement pas possible de remonter à un coefficient de diffusion car la concentration de nanofils à la surface de l'électrode n'est pas connue. Ce paramètre ainsi que d'autres paramètres du transfert d'électrons pourraient être extraits de nouvelles études en électrochimie. Il existe en effet différentes variantes de la voltamétrie cyclique impliquant des électrodes tournantes ou des médiateurs qui permettraient d'en apprendre d'avantage [206].

Une preuve directe de la conduction des nanofils a été obtenue sur des ensembles de nanofils. Des électrodes peuvent être évaporées sur un échantillon de gel séché et permettre des mesures tension/courant. Cela donne lieu à des échantillons qui présentent un caractère ohmique avec une résistance variant de 100 k Ω à 100 M Ω à température ambiante. Cette résistance a tendance à augmenter légèrement avec le vieillissement de l'échantillon, avant de se stabiliser, puis de devenir subitement infinie. L'échantillon ayant eu la meilleure longévité a conduit le courant pendant un peu plus d'un mois. Cette résistance limitée dans le temps est à prendre en considération pour des applications futures. Elle confirme l'orientation préférentielle de ces objets vers des dispositifs à durée limitée comme des matériaux résorbables ou jetables. L'évolution de cette résistance en fonction de la température permet d'en apprendre plus sur le mode de transfert des électrons à l'intérieur des nanofils. La conductance (inverse de la résistance) suit une loi à deux composantes qui est cohérente avec un transfert par effet tunnel. L'une des deux composantes est indépendante de la température et l'autre décroît exponentiellement en fonction de l'inverse de la température. La constante domine à faible température et l'autre devient plus importante lorsque la température passe au-dessus de la valeur charnière de 180 °K. Une telle dépendance en température a déjà été observée dans le cas de transferts naturels impliquant le cytochrome [215]. Cette évolution rappelle celle de la

dynamique des protéines. Celle-ci présente une rupture entre 150 et 200 °K qui pourrait être à l'origine de la transition entre les composantes du transfert d'électrons. La corrélation entre les deux transitions pourrait être investiguée d'avantage par des mesures de diffusion de neutrons, qui sont classiquement utilisées pour l'étude de la dynamique interne des protéines [217].

Ces différents résultats ont servi de base à l'écriture d'une demande de brevet. Celle-ci a été déposée le 7 mars 2011, porte le numéro FR 1151851 et s'intitule « NANOFIL ELECTROCONDUCTEUR BIODEGRADABLE, SON PROCEDE DE FABRICATION ET SES UTILISATIONS ». Cette demande revendique l'utilisation d'une construction peptidique impliquant un domaine formant des fibres amyloïdes et un domaine à centre redox pour réaliser un nanofil de protéine.

Les différentes preuves obtenues sur la conduction des nanofils ne concernent que des ensembles de protéines. Il y a donc des effets de groupe qui peuvent être variables. Il est important de déterminer les caractéristiques de conduction d'un nanofil isolé afin d'en connaître le potentiel réel. Pour cela, différentes techniques ont été mises en œuvre.

La première a consisté en un dépôt aléatoire de nanofils sur des électrodes. Malgré l'imagerie AFM, il est difficile de savoir si des nanofils traversent vraiment les électrodes. De plus, le dépôt des nanofils par dessus les électrodes implique généralement de fortes résistances de contact. Il est donc préférable de venir mettre les électrodes par dessus. Il n'est cependant pas possible d'effectuer de lithographie à cause du caractère organique des nanofils. Une électrode a été déposée aléatoirement sur des échantillons afin que les nanofils présents en bordure de cette électrode puissent être contactées entre l'électrode d'un côté et une pointe AFM de l'autre. La manière de déposer l'électrode a été mise au point pour obtenir des échantillons exploitables. Cependant, la réalisation concrète d'un contact entre la pointe AFM et le nanofil présente des difficultés qui n'ont pas encore été levées. Il n'a donc pas encore été possible de réaliser une mesure de courant sur des nanofils isolés. De manière plus générale, la caractérisation d'objets mous nanostructurés par AFM est un domaine en pleine évolution. De nouvelles méthodes sont régulièrement développées par des chercheurs académiques et quelques produits industriels apparaissent [210]. C'est donc un axe de recherche à approfondir car il y a un vrai potentiel d'amélioration de la technique pour aboutir à des mesures de courant.

En termes d'applications, les gels de nanofils ont déjà montré leur capacité à conduire le courant et peuvent déjà être exploités. Ces hydrogels conducteurs et biodégradables pourraient être exploités comme matrice conductrice pour des biocapteurs ou du photovoltaïque. Là encore, des applications sur des objets jetables ou résorbables sont privilégiées. Le principe serait d'ajouter une troisième protéine sur les nanofils. Cette protéine produirait des électrons qui seraient collectés par le gel de nanofils et alimenteraient un dispositif électronique. Dans le cas du photovoltaïque, une protéine photosensible comme la rhodopsine pourrait être exploitée. Dans le cas des biocapteurs, une activité enzymatique telle celle de la glucose-oxydase ou de la cholestérol-estérase permettrait de détecter la présence de leur substrat respectif. Ces mêmes dispositifs pourraient également servir de bio-pile car ils permettent de produire des électrons à partir de molécules biologiques.

Références bibliographiques

- [1] A. Wood, Chemical Week, 165 (2003) 46.
- [2] D.K. Platt, biodegradable polymers market report, 2006.
- [3] H. Kab, Kunststoffe-Plast Europe, 92 (2002) 34.
- [4] Journal Officiel de la République Française, 0087 (2009) 6438.
- [5] M. Flieger, M. Kantorova, A. Prell, T. Rezanka, J. Votruba, Folia Microbiologica, 48 (2003) 27.
- [6] L.S. Nair, C.T. Laurencin, Progress in Polymer Science, 32 (2007) 762.
- [7] R.A. Gross, B. Kalra, Science, 297 (2002) 803.
- [8] A.K. Mohanty, M. Misra, G. Hinrichsen, Macromolecular Materials and Engineering, 276 (2000) 1.
- [9] Y. Ikada, H. Tsuji, Macromolecular Rapid Communications, 21 (2000) 117.
- [10] P. Alvarenga, P. Palma, A.P. Goncalves, R.M. Fernandes, A.C. Cunha-Queda, E. Duarte, G. Vallini, Environment International, 33 (2007) 505.
- [11] S. Bagherra, Contribution à l'évaluation des impacts environnementaux des sacs de caisse, ADEME, 2005.
- [12] D.F. Williams, Journal of Materials Science, 22 (1987) 3421.
- [13] D. Campoccia, P. Doherty, M. Radice, P. Brun, G. Abatangelo, D.F. Williams, Biomaterials, 19 (1998) 2101.
- [14] D.S. Metsger, T.D. Driskell, J.R. Paulsrud, Journal of the American Dental Association, 105 (1982) 1035.
- [15] W.S. Pietrzak, B.L. Eppey, Journal of Craniofacial Surgery, 11 (2000) 575.
- [16] S.S. Nalwa, G.K. Hartig, T. Warner, N.P. Connor, M.J. Thielman, Annals of Otology Rhinology and Laryngology, 110 (2001) 993.
- [17] C. Lesieur, B. VecseySemjen, L. Abrami, M. Fivaz, F.G. vanderGoot, Mol. Membr. Biol., 14 (1997) 45.
- [18] D.R. Eyre, Science, 207 (1980) 1315.
- [19] C.C. Moser, C.C. Page, P.L. Dutton, Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences, 361 (2006) 1295.
- [20] M. Fontecave, Nature Chemical Biology, 2 (2006) 171.
- [21] V. Dinca, E. Kasotakis, J. Catherine, A. Mourka, A. Ranella, A. Ovsianikov, B.N. Chichkov, M. Farsari, A. Mitraki, C. Fotakis, Nano Lett., 8 (2008) 538.
- [22] H.T. Ng, A.P. Fang, L.Q. Huang, S.F.Y. Li, Langmuir, 18 (2002) 6324.
- [23] G.N. Ramachandran, C. Ramakrishnan, V. Sasisekharan, J. Mol. Biol., 7 (1963) 95.
- [24] W.E. Stites, Chem. Rev., 97 (1997) 1233.
- [25] G. de Gonzalo, M.D. Mihovilovic, M.W. Fraaije, ChemBioChem, 11 2208.
- [26] T. Hudlicky, J.W. Reed, Chem. Soc. Rev., 38 (2009) 3117.
- [27] A. Le Goff, V. Artero, B. Jousset, P.D. Tran, N. Guillet, R. Metaye, A. Fihri, S. Palacin, M. Fontecave, Science, 326 (2009) 1384.
- [28] A. Volbeda, M.H. Charon, C. Piras, E.C. Hatchikian, M. Frey, J.C. Fontecillacamps, Nature, 373 (1995) 580.
- [29] S. Canaguier, M. Field, Y. Oudart, J. Pecaut, M. Fontecave, V. Artero, Chem. Commun., 46 5876.
- [30] E. Schultz, R. Galland, D. Du Bouetiez, T. Flahaut, A. Planat-Chretien, F. Lesbre, A. Hoang, H. Volland, F. Perraut, Biosens. Bioelectron., 23 (2008) 987.
- [31] O. Courjean, F. Gao, N. Mano, Angewandte Chemie-International Edition, 48 (2009) 5897.
- [32] E. Maillart, K. Brengel-Pesce, D. Capela, A. Roget, T. Livache, M. Canva, Y. Levy, T. Soussi, Oncogene, 23 (2004) 5543.
- [33] M.A. Cooper, Nat. Rev. Drug Discov., 1 (2002) 515.
- [34] A. Ibraheem, R.E. Campbell, Curr. Opin. Chem. Biol., 14 30.
- [35] H. Volland, L.M. Neuburger, E. Schultz, J. Grassi, F. Perraut, C. Creminon, Anal. Chem., 77 (2005) 1896.

- [36] F. Lucarelli, S. Tombelli, M. Minunni, G. Marrazza, M. Mascini, *Anal. Chim. Acta*, 609 (2008) 139.
- [37] A.S. Sadek, R.B. Karabalin, J.G. Du, M.L. Roukes, C. Koch, S.C. Masmanidis, *Nano Lett.*, 10 1769.
- [38] S. Joseph, R.J. Mashl, E. Jakobsson, N.R. Aluru, *Ion Channel based biosensors: Ionic transport in carbon nanotubes*, Computational Publications, Cambridge, 2003.
- [39] L.K. Lee, M.A. Ginsburg, C. Crovace, M. Donohoe, D. Stock, *Nature*, 466 996.
- [40] K. Namba, T. Minamino, K. Imada, *Current Opinion in Structural Biology*, 18 (2008) 693.
- [41] E.J. Enernark, L. Joshua-Tor, *Current Opinion in Structural Biology*, 18 (2008) 243.
- [42] J. Gelles, R. Landick, *Cell*, 93 (1998) 13.
- [43] W. Hwang, M.J. Lang, *Cell Biochemistry and Biophysics*, 54 (2009) 11.
- [44] A. Kakugo, K. Shikinaka, J.P. Gong, *International Journal of Molecular Sciences*, 9 (2008) 1685.
- [45] R.D. Vale, R.A. Milligan, *Science*, 288 (2000) 88.
- [46] A. Mansson, M. Sundberg, R. Bunk, M. Balaz, I.A. Nicholls, P. Omling, J.O. Tegenfeldt, S. Tagerud, L. Montelius, *Ieee Transactions on Advanced Packaging*, 28 (2005) 547.
- [47] M. Sundberg, R. Bunk, N. Albet-Torres, A. Kvennefors, F. Persson, L. Montelius, I.A. Nicholls, S. Ghatnekar-Nilsson, P. Omling, S. Tagerud, A. Mansson, *Langmuir*, 22 (2006) 7286.
- [48] F. Fulga, D.V. Nicolau, *Integrative Biology*, 1 (2009) 150.
- [49] H. Hess, *Soft Matter*, 2 (2006) 669.
- [50] M.G.L. van den Heuvel, C. Dekker, *Science*, 317 (2007) 333.
- [51] A.C. Reymann, J.L. Martiel, T. Cambier, L. Blanchoin, R. Boujemaa-Paterski, M. Thery, *Nat. Mater.*, 9 827.
- [52] M.C. Ledbetter, K.R. Porter, *J. Cell Biol.*, 19 (1963) 239.
- [53] S. Lagziel-Simis, N. Cohen-Hadar, H. Moscovich-Dagan, Y. Wine, A. Freeman, *Current Opinion in Biotechnology*, 17 (2006) 569.
- [54] M. Nigen, C. Gaillard, T. Croguennec, M.N. Madec, S. Bouhallab, *Biophys. Chem.*, 146 30.
- [55] M.R.H. Krebs, G.L. Devlin, A.M. Donald, *Biophys. J.*, 92 (2007) 1336.
- [56] L.A. Lee, Z.W. Niu, Q. Wang, *Nano Research*, 2 (2009) 349.
- [57] M. Uchida, M.T. Klem, M. Allen, P. Suci, M. Flenniken, E. Gillitzer, Z. Varpness, L.O. Liepold, M. Young, T. Douglas, *Adv. Mater.*, 19 (2007) 1025.
- [58] F.C. Meldrum, B.R. Heywood, S. Mann, *Science*, 257 (1992) 522.
- [59] J.W. Kim, S.H. Choi, P.T. Lillehei, S.H. Chu, G.C. King, G.D. Watt, *Chem. Commun.* (2005) 4101.
- [60] V. Lordi, N. Yao, *J. Chem. Phys.*, 109 (1998) 2509.
- [61] I. Capek, *Advances in Colloid and Interface Science*, 150 (2009) 63.
- [62] S. Iijima, *Nature*, 354 (1991) 56.
- [63] Z.Q. Liu, W.Y. Zhou, L.F. Sun, D.S. Tang, X.P. Zou, Y.B. Li, C.Y. Wang, G. Wang, S.S. Xie, *Chemical Physics Letters*, 341 (2001) 523.
- [64] W. Lu, C.M. Lieber, *Journal of Physics D-Applied Physics*, 39 (2006) R387.
- [65] M. Reches, E. Gazit, *Science*, 300 (2003) 625.
- [66] M. Malisauskas, R. Meskys, L.A. Morozova-Roche, *Biotechnology Progress*, 24 (2008) 1166.
- [67] F. Patolsky, Y. Weizmann, I. Willner, *Nat. Mater.*, 3 (2004) 692.
- [68] T. Scheibel, R. Parthasarathy, G. Sawicki, X.M. Lin, H. Jaeger, S.L. Lindquist, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 100 (2003) 4527.
- [69] E. Kasotakis, E. Mossou, L. Adler-Abramovich, E.P. Mitchell, V.T. Forsyth, E. Gazit, A. Mitraki, *Biopolymers*, 92 (2009) 164.
- [70] R. Kirsch, M. Mertig, W. Pompe, R. Wahl, G. Sadowski, K.J. Bohm, E. Unger, *Thin Solid Films*, 305 (1997) 248.
- [71] O. Carny, D.E. Shalev, E. Gazit, *Nano Lett.*, 6 (2006) 1594.
- [72] L. Adler-Abramovich, E. Gazit, *Journal of Peptide Science*, 14 (2008) 217.
- [73] M. Di Marco, S. Shamsuddin, K.A. Razak, A.A. Aziz, C. Devaux, E. Borghi, L. Levy, C. Sadun, *International Journal of Nanomedicine*, 5 37.

- [74] R. Ogaki, M. Alexander, P. Kingshott, *Materials Today*, 13 22.
- [75] B.T. Chaffey, E. Mitchell, M.A. Birch, J.H. Lakey, *International Journal of Nanomedicine*, 3 (2008) 287.
- [76] D.E. Khoshdariya, T.D. Dolidze, M. Shushanyan, K.L. Davis, D.H. Waldeck, R. van Eldik, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 107 2757.
- [77] S.B.N. Biancardo, H.J. Pranov, N.B. Larsen, *Adv. Mater.*, 20 (2008) 1825.
- [78] D. Pisignano, M. Mazzeo, P. Visconti, R. Rinaldi, G. Gigli, R. Cingolani, *Synthetic Metals*, 137 (2003) 1483.
- [79] H. Badelt-Lichtblau, B. Kainz, C. Vollenkle, E.M. Egelseer, U.B. Sleytr, D. Pum, N. Ilk, *Bioconjugate Chemistry*, 20 (2009) 895.
- [80] S. Dieluweit, D. Pum, U.B. Sleytr, *Supramolecular Science*, 5 (1998) 15.
- [81] U.B. Sleytr, M. Sara, *Trends in Biotechnology*, 15 (1997) 20.
- [82] T.P.J. Knowles, T.W. Oppenheim, A.K. Buell, D.Y. Chirgadze, M.E. Welland, *Nature Nanotechnology*, 5 204.
- [83] J. Jenkins, V.E. Shevchik, N. Hugouvieux-Cotte-Pattat, R.W. Pickersgill, *J. Biol. Chem.*, 279 (2004) 9139.
- [84] S.W. Muchmore, M. Sattler, H. Liang, R.P. Meadows, J.E. Harlan, H.S. Yoon, D. Nettekheim, B.S. Chang, C.B. Thompson, S.L. Wong, S.C. Ng, S.W. Fesik, *Nature*, 381 (1996) 335.
- [85] K. Palczewski, T. Kumasaka, T. Hori, C.A. Behnke, H. Motoshima, B.A. Fox, I. Le Trong, D.C. Teller, T. Okada, R.E. Stenkamp, M. Yamamoto, M. Miyano, *Science*, 289 (2000) 739.
- [86] D.K. Georgiou, P.G. Vekilov, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 103 (2006) 1681.
- [87] A.L. Margolin, M.A. Navia, *Angewandte Chemie-International Edition*, 40 (2001) 2205.
- [88] N.S. Clair, B. Shenoy, L.D. Jacob, A.L. Margolin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 96 (1999) 9469.
- [89] L.Z. Vilenchik, J.P. Griffith, N. St Clair, M.A. Navia, A.L. Margolin, *J. Am. Chem. Soc.*, 120 (1998) 4290.
- [90] N. Cohen-Hadar, Y. Wine, E. Nachliel, D. Huppert, M. Gutman, F. Frolow, A. Freeman, *Biotechnology and Bioengineering*, 94 (2006) 1005.
- [91] G. Bhak, S. Lee, J.W. Park, S. Cho, S.R. Paik, *Biomaterials*, 31 5986.
- [92] A. George, S. Ravindran, *Nano Today*, 5 254.
- [93] S.L. Gras, A.K. Tickler, A.M. Squires, G.L. Devlin, M.A. Horton, C.M. Dobson, C.E. MacPhee, *Biomaterials*, 29 (2008) 1553.
- [94] M. Marimuthu, S. Kim, *Current Nanoscience*, 5 (2009) 189.
- [95] M.J. Krysmann, V. Castelletto, A. Kalarakis, I.W. Hamley, R.A. Hule, D.J. Pochan, *Biochemistry*, 47 (2008) 4597.
- [96] R. Flaminia, A.M. Salvi, L. D'Alessio, J.E. Castle, A.M. Tamburro, *Biomacromolecules*, 8 (2007) 128.
- [97] J.G. Hardy, L.M. Romer, T.R. Scheibel, *Polymer*, 49 (2008) 4309.
- [98] A. Gole, C. Dash, V. Ramakrishnan, S.R. Sainkar, A.B. Mandale, M. Rao, M. Sastry, *Langmuir*, 17 (2001) 1674.
- [99] S.M. Pilkington, S.J. Roberts, S.J. Meade, J.A. Gerrard, *Biotechnology Progress*, 26 (2010) 93.
- [100] Y. Arikuma, H. Nakayama, T. Morita, S. Kimura, *Angewandte Chemie-International Edition*, 49 (2010) 1800.
- [101] F.E. Cohen, M.J.E. Sternberg, W.R. Taylor, *J. Mol. Biol.*, 156 (1982) 821.
- [102] K. Chockalingam, M. Blenner, S. Banta, *Protein Engineering Design & Selection*, 20 (2007) 155.
- [103] S. Banta, Z. Megeed, M. Casali, K. Rege, M.L. Yarmush, *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 7 (2007) 387.
- [104] X.J. Zhao, S.G. Zhang, *Trends in Biotechnology*, 22 (2004) 470.
- [105] S. Cavalli, F. Albericio, A. Kros, *Chem. Soc. Rev.*, 39 241.
- [106] G. Colombo, P. Soto, E. Gazit, *Trends in Biotechnology*, 25 (2007) 211.
- [107] E. Gazit, M. Reches, *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, 229 (2005) U1154.
- [108] H. Matsui, R. MacCuspie, *Nano Lett.*, 1 (2001) 671.
- [109] S. Toksoz, M.O. Guler, *Nano Today*, 4 (2009) 458.
- [110] D.N. Woolfson, M.G. Ryadnov, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 10 (2006) 559.
- [111] J.D. Sipe, A.S. Cohen, *J. Struct. Biol.*, 130 (2000) 88.

- [112] F. Bemporad, G. Calloni, S. Campioni, G. Plakoutsi, N. Taddei, F. Chiti, *Accounts of Chemical Research*, 39 (2006) 620.
- [113] I. Cherny, L. Rockah, O. Levy-Nissenbau, U. Gophna, E.Z. Ron, E. Gazit, *J. Mol. Biol.*, 352 (2005) 245.
- [114] R.B. Wickner, F. Shewmaker, H. Edskes, D. Kryndushkin, J. Nemecek, R. McGlinchey, D. Bateman, C.L. Winchester, *Fems Yeast Research*, 10 980.
- [115] P.V. Kulkarni, C.A. Roney, P.P. Antich, F.J. Bonte, A.V. Raghu, T.M. Aminabhavi, *Wiley Interdiscip. Rev.-Nanomed. Nanobiotechnol.*, 2 35.
- [116] M. Fandrich, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64 (2007) 2066.
- [117] O.S. Makin, L.C. Serpell, *Febs Journal*, 272 (2005) 5950.
- [118] V. Sikirzhyski, N.I. Topilina, S. Higashiya, J.T. Welch, I.K. Lednev, *J. Am. Chem. Soc.*, 130 (2008) 5852.
- [119] H. Atamna, W.H. Frey, *Mitochondrion*, 7 (2007) 297.
- [120] K.M. Cullen, Z. Kocsi, J. Stone, *Neurobiology of Aging*, 27 (2006) 1786.
- [121] D. Eisenberg, R. Nelson, M.R. Sawaya, M. Balbirnie, S. Sambashivan, M.I. Ivanova, A.O. Madsen, C. Riek, *Accounts of Chemical Research*, 39 (2006) 568.
- [122] R. Riek, S. Hornemann, G. Wider, M. Billeter, R. Glockshuber, K. Wuthrich, *Nature*, 382 (1996) 180.
- [123] A.T. Petkova, Y. Ishii, J.J. Balbach, O.N. Antzutkin, R.D. Leapman, F. Delaglio, R. Tycko, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 99 (2002) 16742.
- [124] F. Castellani, B. van Rossum, A. Diehl, M. Schubert, K. Rehbein, H. Oschkinat, *Nature*, 420 (2002) 98.
- [125] R.R. Ketchum, B. Roux, T.A. Cross, *Structure*, 5 (1997) 1655.
- [126] C. Wasmer, A. Lange, H. Van Melckebeke, A.B. Siemer, R. Riek, B.H. Meier, *Science*, 319 (2008) 1523.
- [127] R. Tycko, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, 42 (2003) 53.
- [128] S.S. Rogers, P. Venema, L.M.C. Sagis, E. van der Linden, A.M. Donald, *Macromolecules*, 38 (2005) 2948.
- [129] Shiraham.T, A.S. Cohen, *J. Cell Biol.*, 33 (1967) 679.
- [130] A. Sen, U. Baxa, M.N. Simon, J.S. Wall, R. Sabate, S.J. Saupe, A.C. Steven, *J. Biol. Chem.*, 282 (2007) 5545.
- [131] S.B. Prusiner, M.P. McKinley, K.A. Bowman, D.C. Bolton, P.E. Bendheim, D.F. Groth, G.G. Glenner, *Cell*, 35 (1983) 349.
- [132] R. Sabate, U. Baxa, L. Benkemouni, N.S. de Groot, B. Coulary-Salin, M.L. Maddelein, L. Malato, S. Ventura, A.C. Steven, S.J. Saupe, *J. Mol. Biol.*, 370 (2007) 768.
- [133] H. Wojtasek, W.S. Leal, *J. Biol. Chem.*, 274 (1999) 30950.
- [134] M. Kavanoor, M.R. Eftink, *Biophys. Chem.*, 66 (1997) 43.
- [135] P. Juszczak, A.S. Kolodziejczyk, Z. Grzonka, *Journal of Peptide Science*, 15 (2009) 23.
- [136] G. Zandomenighi, M.R.H. Krebs, M.G. McCammon, M. Fandrich, *Protein Science*, 13 (2004) 3314.
- [137] E.D. Eanes, G.G. Glenner, *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 16 (1968) 673.
- [138] M. Sunde, L.C. Serpell, M. Bartlam, P.E. Fraser, M.B. Pepys, C.C.F. Blake, *J. Mol. Biol.*, 273 (1997) 729.
- [139] P. Sikorski, E.D.T. Atkins, L.C. Serpell, *Structure*, 11 (2003) 915.
- [140] L.C. Serpell, P.E. Fraser, M. Sunde, *Amyloid, Prions, and Other Protein Aggregates*, Academic Press Inc, San Diego, 1999, p. 526.
- [141] O.S. Makin, E. Atkins, P. Sikorski, J. Johansson, L.C. Serpell, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 102 (2005) 315.
- [142] B. Morel, L. Varela, F. Conejero-Lara, *Journal of Physical Chemistry B*, 114 4010.
- [143] S.K. Maji, L. Wang, J. Greenwald, R. Riek, *Febs Letters*, 583 (2009) 2610.
- [144] G. Maurstad, M. Prass, L.C. Serpell, P. Sikorski, *European Biophysics Journal with Biophysics Letters*, 38 (2009) 1135.
- [145] J.A. Lemkul, D.R. Bevan, *Journal of Physical Chemistry B*, 114 (2010) 1652.
- [146] S. Ketten, M.J. Buehler, *Computer Methods in Applied Mechanics and Engineering*, 197 (2008) 3203.
- [147] A. Buttstedt, R. Winter, M. Sackewitz, G. Hause, F.X. Schmid, E. Schwarz, *Plos One*, 5 10.
- [148] J.F. Smith, T.P.J. Knowles, C.M. Dobson, C.E. MacPhee, M.E. Welland, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 103 (2006) 15806.

- [149] S.L. Gras, *Advanced Powder Technology*, 18 (2007) 699.
- [150] A.J. Baldwin, R. Bader, J. Christodoulou, C.E. MacPhee, C.M. Dobson, P.D. Barker, *J. Am. Chem. Soc.*, 128 (2006) 2162.
- [151] M. Reches, E. Gazit, *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 7 (2007) 2239.
- [152] L.L. del Mercato, P.P. Pompa, G. Maruccio, A. Della Torre, S. Sabella, A.M. Tamburro, R. Cingolani, R. Rinaldi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 104 (2007) 18019.
- [153] A. Balguerie, S. Dos Reis, C. Ritter, S. Chaignepain, B. Couлары-Salin, V. Forge, K. Bathany, I. Lascu, J.M. Schmitter, R. Riek, S.J. Saupe, *Embo Journal*, 22 (2003) 2071.
- [154] S. Dos Reis, B. Couлары-Salin, V. Forge, I. Lascu, J. Begueret, S.J. Saupe, *J. Biol. Chem.*, 277 (2002) 5703.
- [155] A. Balguerie, S. Dos Reis, B. Couлары-Salin, S. Chaignepain, M. Sabourin, J.M. Schmitter, S.J. Saupe, *Journal of Cell Science*, 117 (2004) 2599.
- [156] A. Sen, U. Baxa, M.N. Simon, J.S. Wall, R. Sabate, S.J. Saupe, A.C. Steven, *Biophys. J.* (2007) 560a.
- [157] C. Wasmer, A. Soragni, R. Sabate, A. Lange, R. Riek, B.H. Meier, *Angewandte Chemie-International Edition*, 47 (2008) 5839.
- [158] H. Van Melckebeke, C. Wasmer, A. Lange, A.B. Eiso, A. Loquet, A. Bockmann, B.H. Meier, *J. Am. Chem. Soc.*, 132 13765.
- [159] G.I. Makhatadze, V.V. Loladze, D.N. Ermolenko, X.F. Chen, S.T. Thomas, *J. Mol. Biol.*, 327 (2003) 1135.
- [160] A.Y.M. Woody, R.W. Woody, *Biophys. J.*, 86 (2004) 499A.
- [161] M.D. Yoder, N.T. Keen, F. Jurnak, *Science*, 260 (1993) 1503.
- [162] A.J. Heeger, S. Kivelson, J.R. Schrieffer, W.P. Su, *Rev. Mod. Phys.*, 60 (1988) 781.
- [163] P.P. Pompa, A. Della Torre, L.L. del Mercato, R. Chiuri, A. Bramanti, F. Calabi, G. Maruccio, R. Cingolani, R. Rinaldi, *J. Chem. Phys.*, 125 (2006) 4.
- [164] P. Tu, J. Gibon, A. Bouron, *J. Neurochem.*, 112 204.
- [165] M.Y. El-Naggar, G. Wanger, K.M. Leung, T.D. Yuzvinsky, G. Southam, J. Yang, W.M. Lau, K.H. Nealson, Y.A. Gorby, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 107 18127.
- [166] Y.A. Gorby, S. Yanina, J.S. McLean, K.M. Rosso, D. Moyles, A. Dohnalkova, T.J. Beveridge, I.S. Chang, B.H. Kim, K.S. Kim, D.E. Culley, S.B. Reed, M.F. Romine, D.A. Saffarini, E.A. Hill, L. Shi, D.A. Elias, D.W. Kennedy, G. Pinchuk, K. Watanabe, S. Ishii, B. Logan, K.H. Nealson, J.K. Fredrickson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 103 (2006) 11358.
- [167] J.S. McLean, G. Wanger, Y.A. Gorby, M. Wainstein, J. McQuaid, S.I. Ishii, O. Bretschger, H. Beyenal, K.H. Nealson, *Environ. Sci. Technol.*, 44 2721.
- [168] C.C. Page, C.C. Moser, X.X. Chen, P.L. Dutton, *Nature*, 402 (1999) 47.
- [169] H.B. Gray, J.R. Winkler, *Annual Review of Biochemistry*, 65 (1996) 537.
- [170] H.B. Gray, J.R. Winkler, *Chemical Physics Letters*, 483 (2009) 1.
- [171] P.E.M. Siegbahn, M.R.A. Blomberg, *Chem. Rev.*, 110 7040.
- [172] D.R. Casimiro, J.H. Richards, J.R. Winkler, H.B. Gray, *J. Phys. Chem.*, 97 (1993) 13073.
- [173] O. Farver, L.K. Skov, S. Young, N. Bonander, B.G. Karlsson, T. Vanngard, I. Pecht, *J. Am. Chem. Soc.*, 119 (1997) 5453.
- [174] X.H. Chen, L.B. Zhang, L. Zhang, J. Wang, H.Y. Liu, Y.X. Bu, *Journal of Physical Chemistry B*, 113 (2009) 16681.
- [175] M.S. Cheung, I. Daizadeh, A.A. Stuchebrukhov, P.F. Heelis, *Biophys. J.*, 76 (1999) 1241.
- [176] M. Sjodin, S. Styring, H. Wolpher, Y.H. Xu, L.C. Sun, L. Hammarstrom, *J. Am. Chem. Soc.*, 127 (2005) 3855.
- [177] A.M. Kannan, V. Renugopalakrishnan, S. Filipek, P. Li, G.F. Audette, L. Munukutla, *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 9 (2009) 1665.
- [178] X.C. Tan, M.J. Li, P.X. Cai, L.J. Luo, X.Y. Zou, *Anal. Biochem.*, 337 (2005) 111.
- [179] M. Atta, M.E. Lafferty, M.K. Johnson, J. Gaillard, J. Meyer, *Biochemistry*, 37 (1998) 15974.
- [180] R. Kummerle, M. Atta, J. Sculler, J. Gaillard, J. Meyer, *Biochemistry*, 38 (1999) 1938.
- [181] J. Meyer, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 13 (2008) 157.

- [182] W.Y. Lee, D.C. Brune, R. Lobrutto, R.E. Blankenship, Archives of Biochemistry and Biophysics, 318 (1995) 80.
- [183] Z. Dauter, K.S. Wilson, L.C. Sieker, J.M. Moulis, J. Meyer, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 93 (1996) 8836.
- [184] M.J. Meyer J, Handbook of Metalloproteins, 2001.
- [185] M.K. Eidsness, K.A. Richie, A.E. Burden, D.M. Kurtz, R.A. Scott, Biochemistry, 36 (1997) 10406.
- [186] J. Peisach, W.E. Blumberg, E.T. Lode, M.J. Coon, J. Biol. Chem., 246 (1971) 5877.
- [187] C.M. Gomes, J.B. Vicente, A. Wasserfallen, M. Teixeira, Biochemistry, 39 (2000) 16230.
- [188] L.A. Alcaraz, J. Gomez, P. Ramirez, J.J. Calvente, R. Andreu, A. Donaire, Bioinorganic Chemistry and Applications (2007) 9.
- [189] J.R. Winkler, H.B. Gray, Chem. Rev., 92 (1992) 369.
- [190] M.R. Ghadiri, C. Soares, C. Choi, J. Am. Chem. Soc., 114 (1992) 4000.
- [191] J. Littlechild, E.G. Rodriguez, M. Isupov, J. Inorg. Biochem., 103 (2009) 617.
- [192] T. Hamada, H. Ishida, M. Kuwada, K. Ohkubo, Chem. Lett. (1992) 1283.
- [193] L.H. Guo, P.P. Stepien, J.Y. Tso, R. Brousseau, S. Narang, D.Y. Thomas, R. Wu, Gene, 29 (1984) 251.
- [194] G. Tishchenko, J. Dybal, K. Meszarosova, Z. Sedlakova, M. Bleha, J. Chromatogr. A, 954 (2002) 115.
- [195] J.X. Lu, J.P. Bitoun, G.Q. Tan, W. Wang, W.G. Min, H.G. Ding, Biochem. J., 428 125.
- [196] M. Biancalana, S. Koide, BBA-Proteins Proteomics, 1804 1405.
- [197] V.I. Stsiapura, A.A. Maskevich, V.A. Kuzmitsky, K.K. Turoverov, I.M. Kuznetsova, J. Phys. Chem. A, 111 (2007) 4829.
- [198] R. Khurana, C. Coleman, C. Ionescu-Zanetti, S.A. Carter, V. Krishna, R.K. Grover, R. Roy, S. Singh, J. Struct. Biol., 151 (2005) 229.
- [199] M.R. Nichols, M.A. Moss, D.K. Reed, W.L. Lin, R. Mukhopadhyay, J.H. Hoh, T.L. Rosenberry, Biochemistry, 41 (2002) 6115.
- [200] V. Militello, C. Casarino, A. Emanuele, A. Giostra, F. Pullara, M. Leone, Biophys. Chem., 107 (2004) 175.
- [201] C. Wasmer, L. Benkemoun, R. Sabate, M.O. Steinmetz, B. Coulary-Salin, L. Wang, R. Riek, S.J. Saupe, B.H. Meier, Angewandte Chemie-International Edition, 48 (2009) 4858.
- [202] M.E. Hines, E.A. Foegeding, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 41 (1993) 341.
- [203] Z.G. Xiao, M.J. Lavery, M. Ayhan, S.D.B. Scrofani, M.C.J. Wilce, J.M. Guss, P.A. Tregloan, G.N. George, A.G. Wedd, J. Am. Chem. Soc., 120 (1998) 4135.
- [204] V. Mirceski, Z. Tomovski, Journal of Physical Chemistry B, 113 (2009) 2794.
- [205] V. Fourmond, études électrochimiques de chaînes de transfert d'électrons photosynthétiques, UFR de Physique, Denis Diderot Paris 7, Paris, 2007, p. 105.
- [206] G.S. Bedioui Fethi, in: T.d. l'ingénieur (Ed.), 2000.
- [207] Q.D. Ling, D.J. Liaw, C.X. Zhu, D.S.H. Chan, E.T. Kang, K.G. Neoh, Progress in Polymer Science, 33 (2008) 917.
- [208] S.H. Choi, C.D. Frisbie, J. Am. Chem. Soc., 132 16191.
- [209] V. Bouchiat, M. Faucher, T. Fournier, B. Pannetier, C. Thirion, W. Wernsdorfer, N. Clement, D. Tonneau, H. Dallaporta, S. Safarov, J.C. Villegier, D. Fraboulet, D. Mariolle, J. Gautier, Microelectronic Engineering, 61-2 (2002) 517.
- [210] Y. Otsuka, Y. Naitoh, T. Matsumoto, T. Kawai, Japanese Journal of Applied Physics Part 2-Letters, 41 (2002) L742.
- [211] A. Trionfi, D.A. Scrymgeour, J.W.P. Hsu, M.J. Arlen, D. Tomlin, J.D. Jacobs, D.H. Wang, L.S. Tan, R.A. Vaia, Journal of Applied Physics, 104 (2008).
- [212] P. Liu, W.W. Cai, Z.Z. Wang, D.M. Chen, Physica E-Low-Dimensional Systems & Nanostructures, 42 799.
- [213] D. Brune, S. Kim, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 90 (1993) 3835.
- [214] O. Annunziata, D. Buzatu, J.G. Albright, Langmuir, 21 (2005) 12085.
- [215] J. Jortner, J. Chem. Phys., 64 (1976) 4860.

Références bibliographiques

- [216] U.S. Ramelow, S.N. Braganza, G.J. Ramelow, J. Appl. Polym. Sci., 112 (2009) 1916.
- [217] F.G. Parak, K. Achterhold, M. Schmidt, V. Prusakov, S. Croci, Journal of Non-Crystalline Solids, 352 (2006) 4371.
- [218] T. Otsuka, T. Ohya, M. Sato, Inorg. Chem., 26 (1987) 2191.

Annexes

Les annexes sont organisées en plusieurs parties. La première correspond à la description détaillée des différents acides aminés. La deuxième contient tous les éléments relatifs à la production des protéines recombinantes.

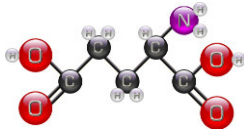
1 Définition des différents acides aminés

Glutamate (Glu) E ou acide glutamique

- Le **glutamate** est un acide aminé acide.
- Le radical de l'acide glutamique est une chaîne de 3 carbones portant une fonction acide carboxylique. Le pK étant de 4,3 cette fonction est presque entièrement ionisée au pH physiologique.
- La **charge négative fait du glutamate un radical très polaire et hydrophile**. Elle crée des liaisons électrovalentes avec des charges électriques positives d'autres acides aminés (Arg, Lys,...), contribuant à la structure tertiaire et quaternaire de la protéine. Le glutamate entre aussi dans la structure de nombreux sites de liaison où il contribue à fixer le ligand par des liaisons électrovalentes.
- Le glutamate représente environ 9 % des acides aminés des protéines de notre organisme. C'est le plus fréquent des 20 acides aminés dans la séquence primaire de nos protéines.
- Certains aliments sont riches en glutamate : pain, céréales ; d'autres en sont pauvres : légumes secs.

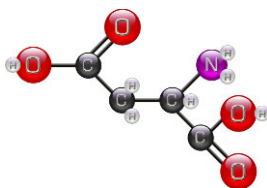
En plus :

- Le **glutamate** est généralement considéré comme le **neurotransmetteur** le plus important pour la fonction cérébrale normale et on estime que plus de la moitié des neurones cérébraux en sécrètent
- L'action des glutamates se révèle très difficile à étudier de par sa **nature éphémère**.



Aspartate (Asp) D, ou acide aspartique

- L'**aspartate** est un **acide aminé acide**.
- Le radical de l'acide aspartique est une chaîne de 2 carbones portant une fonction acide carboxylique. Le pK étant de 4,0 cette fonction est presque entièrement ionisée au pH physiologique. L'aspartate joue un rôle important dans certaines protéines comme la pepsine agissant en milieu acide.
- La charge négative fait de l'aspartate un radical **très polaire et hydrophile**. Elle crée des liaisons électrovalentes avec des charges électriques positives d'autres acides aminés (Arg, Lys,...), contribuant à la structure tertiaire et quaternaire de la protéine. L'aspartate entre aussi dans la structure de nombreux sites de liaison où il contribue à fixer le ligand par des liaisons électrovalentes.
- L'aspartate représente environ 6 % des acides aminés des protéines de notre organisme.
- Certains aliments sont riches en aspartate : pommes de terre, cacahuètes ; d'autres en sont pauvres : soja, pain.

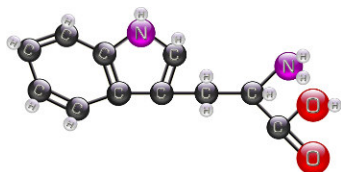


Tryptophan (Trp) W

- Le **tryptophane** est un **acide aminé aromatique** et **essentiel**
- Il est **aromatique**, **apolaire** et **hydrophobe** (comme la phénylalanine).
- Le radical du **tryptophane** comprend un seul carbone suivi d'un carbure aromatique composé de deux noyaux accolés : benzène et pyrrole. Ce noyau est un **noyau indole**.
- L'**hydrophobie** du radical du tryptophane permet la formation de liaisons faibles (dites liaisons hydrophobes) avec d'autres acides aminés hydrophobes (Ile, Phe, Leu, ...) qui contribuent à la structure tertiaire et quaternaire des protéines.
- Le tryptophane représente environ 1 % des acides aminés des protéines de notre organisme. C'est **le plus rare** des 20 acides aminés dans la séquence primaire de nos protéines.
- Certains aliments sont riches en tryptophane : oeufs, noix de coco ; d'autres en sont pauvres : maïs, carottes, chou.

Bon à savoir :

- Très fragile, il est détruit par les acides minéraux, et ne peut être isolé dans les hydrolysats acides des protéines. C'est un acide aminé contenant un hétérocycle indole qui lui confère de propriétés spectroscopiques d'absorption et de fluorescence dans l'UV.
- En 1989, du tryptophane vendu comme supplément alimentaire produit par manipulation génétique d'une bactérie produit une épidémie d'une nouvelle et mystérieuse maladie, le syndrome éosinophilie-myalgie (EMS), qui tua 37 personnes et en rendit 1,500 autres infirmes.

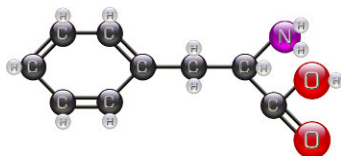


Phénylalanine

- La **phénylalanine** est un **acide aminé aromatique essentiel**
- Le radical de la phénylalanine comprend **un seul carbone** suivi d'un carbure aromatique **très hydrophobe**.
- L'**hydrophobie** du radical de la phénylalanine permet la formation de liaisons faibles (dites liaisons hydrophobes) avec d'autres acides aminés hydrophobes (Ile, Leu, ...) qui contribuent à la structure tertiaire et quaternaire des protéines.
- La phénylalanine représente environ 4 % des acides aminés des protéines de notre organisme.
- Certains aliments sont riches en **phénylalanine** : pain, oeufs, abats ; d'autres en sont pauvres : chou, betteraves.

Autres :

- L'action de la phénylalanine hydroxylase (enzyme) la transforme en un autre acide aminé : la **tyrosine**, qui n'est de ce fait pas un acide aminé essentiel.
- La **phénylalanine** est, avec l'aspartate, l'un des deux constituants de l'**aspartame**, un dipeptide utilisé comme édulcorant dans les boissons et les aliments dits "légers"



Proline (Pro) P

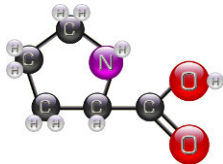
- La **proline** est un **acide- α -aminé**
- Le radical de la proline comprend donc 3 carbones saturés dont le dernier est lié à la fonction α -aminée incluse dans la liaison peptidique. Le tout forme un **noyau pyrrole** (4 carbones et 1 azote).

Annexes

- La présence d'une **proline** dans la structure primaire d'une protéine empêche la constitution des liaisons hydrogènes de la structure secondaire : fin des hélices α , bords des feuillets β , ...

Autres :

- La **proline** représente environ 4 % des acides aminés des protéines de notre organisme.
- Certains aliments sont riches en proline : gélatine, pain, lait ; d'autres en sont pauvres : pommes de terre.
- La **proline** possède une fonction **amine secondaire** et non pas une fonction imine

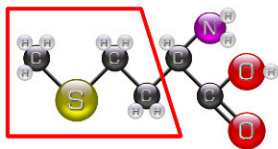


Methionine (Met) M

- La **méthionine** est un **acide- α -aminé soufré essentiel**
- Son radical est **apolaire** et **hydrophobe**. Elle joue un rôle spécifique dans le complexe d'initiation de la biosynthèse des protéines.
- La méthionine représente environ 2 % des acides aminés des protéines de notre organisme.
- Certains aliments sont riches en méthionine : oeufs ; d'autres en sont pauvres : graines végétales, gélatine.

Autres notions :

- La **méthionine** joue un rôle critique dans la reproduction, la survie cellulaire, la méthylation des protéines et de l'ADN
- Le soufre de la **méthionine** est sensible à l'oxydation qui donne lieu à deux dérivés : la méthionine sulfone et la méthionine sulfoxyde
- Rôle de la **vitamine B12** à la synthèse de la méthionine.

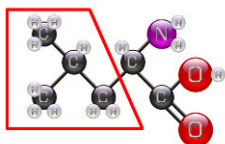


Isoleucine (Iso) I

- Le radical de l'**isoleucine** est le **plus hydrophobe** de tous les radicaux des acides aminés des protéines
- L'hydrophobie du radical de l'isoleucine permet la formation de liaisons faibles (dites liaisons hydrophobes) avec d'autres acides aminés hydrophobes (Phe, Leu, ...) qui contribuent à la structure tertiaire et quaternaire des protéines.

Où est l'isoleucine ?

- L'isoleucine représente moins de 4 % des acides aminés des protéines de notre organisme.

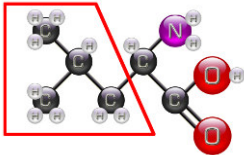


Leucine (Leu) L

- La **leucine** est un acide aminé alpha **essentiel**
- Le radical de la leucine est un carbure saturé et branché, mais symétrique.
- Il est très **hydrophobe** et l'hydrophobie du radical de la leucine permet la formation de liaisons faibles (dites liaisons hydrophobes) avec d'autres acides aminés hydrophobes (Ile, Phe, ...) qui contribuent à la structure tertiaire et quaternaire des protéines.

Où est la leucine ?

- La **leucine** représente environ 8 % des acides aminés des protéines de notre organisme.
- Certains aliments sont riches en **leucine** : lait, maïs ; d'autres en sont pauvres : pommes de terre, betteraves, chou.



Valine (Val) V

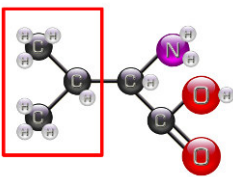
- La **valine** est un **acide aminé essentiel**
- Le radical de la **valine** est un carbure saturé et branché, mais **symétrique**.
- Il est **hydrophobe** et l'**hydrophobie** du radical de la valine permet la formation de **liaisons faibles** (dites liaisons hydrophobes) avec d'autres acides aminés hydrophobes (Ile, Phe, Leu, ...) qui contribuent à la structure tertiaire et quaternaire des protéines.

Où est la valine ?

- La **valine** représente environ 5 % des acides aminés des protéines de notre organisme.
- Certains aliments sont riches en **valine** : lait, oeufs ; d'autres en sont pauvres : pain, chou, betteraves.

Autres notions

- La **L-alanine** est créée dans les cellules musculaires au départ du glutamate dans un processus appelé **transamination**. Dans le foie, l'**alanine** se transforme en **pyruvate**.



Alanine (Ala) A

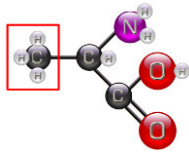
- L'**alanine** est un acide aminé neutre
- C'est le 2ème acide aminé le plus petit, derrière la glycine
- Son radical se réduit à un **méthyl (CH3)**, qui lui confère des propriétés légèrement **apolaires** et **hydrophobes** et ne permet pas de participer à des réactions chimiques

Où est l'Alanine ?

- L'alanine représente environ 6 % des acides aminés des protéines de notre organisme
- Certains aliments sont riches en **alanine** : maïs, abats (triperie) ; d'autres en sont pauvres : lait, légumes secs.

Notions sur son rôle dans le corps

- La **L-alanine** est créée dans les cellules musculaires au départ du glutamate dans un processus appelé **transamination**. Dans le foie, l'**alanine** se transforme en **pyruvate**.

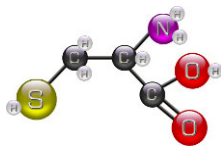


Cystéine (Cys) C

- La **cystéine** est un **acide aminé soufré**.
- Le radical de la cystéine ne comprend qu'un seul carbone porteur d'une **fonction thiol**. Cette fonction peut s'oxyder en se liant à une autre fonction thiol de la protéine formant ce qu'on appelle un pont disulfure.
- Les **ponts disulfures** par leurs liaisons covalentes entre des **cystéines** d'une même chaîne d'acides aminés ou d'une autre chaîne, sont les liens les plus stables de la structure tertiaire et quaternaire des protéines.
- Les formes cystéine et cystine forment des couples d'oxydoréduction dans les protéines, dont le potentiel standard est bas, réducteur ($E^{\circ} = -230$ mv). Ces fonctions sont responsables de l'état d'oxydoréduction variable des protéines.
- La cystéine représente environ 1 % des acides aminés des protéines de notre organisme.
- Certains aliments sont riches en cystéine : poissons ; d'autres en sont pauvres : lait de vache, lentilles. La gélatine en est dépourvue.

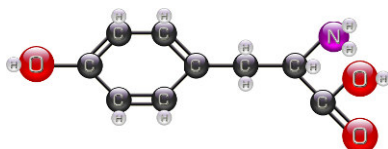
Anecdote :

- Les moutons ont besoin de **cystéine pour produire de la laine**, c'est un acide aminé essentiel qu'ils ne peuvent pas synthétiser. Ils doivent donc le trouver dans leur alimentation. Cela signifie que durant une période de sécheresse, les moutons arrêtent de produire de la laine.



Tyrosine (Tyr) Y

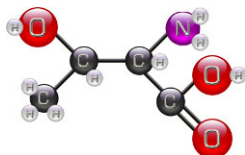
- La **tyrosine** est un **acide aminé aromatique**.
- Le radical de la tyrosine comprend un seul carbone suivi d'un carbure aromatique. A l'opposé, le noyau porte une fonction phénol.
- Le radical de la **tyrosine** n'est pas hydrophobe. La présence de la fonction phénol, faiblement acide ($pK = 10,1$), rend ce radical beaucoup plus polaire.
- Les échanges d'hydrogène avec le noyau phénol se faisant facilement, la tyrosine est un radical fréquent dans les **sites catalytiques des enzymes**.
- De nombreuses réactions chimiques mettant en évidence la fonction phénol des tyrosines servent à doser les protéines dans les liquides biologiques.
- La tyrosine représente environ 3 % des acides aminés des protéines de notre organisme.
- Certains aliments sont riches en tyrosine : fromage, lait, riz ; d'autres en sont pauvres : pommes de terre, chou.



Thréonine (Thr) T

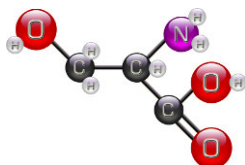
- La **thréonine** est un **acide aminé alcool**.

- Le radical de la **thréonine** comprend 2 carbones dont le premier est porteur d'une fonction **alcool secondaire**. Ce radical est donc **asymétrique**.
- Cette fonction alcool permet des **estérifications**.
- La thréonine représente environ 4 % des acides aminés des protéines de notre organisme.
- Certains aliments sont riches en thréonine : oeufs ; d'autres en sont pauvres : pain, haricots verts, oléagineux.



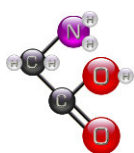
Sérine (Ser) S

- La **sérine** est un acide aminé alcool.
- Le radical de la sérine comprend un seul carbone porteur d'une fonction **alcool primaire**.
- Cette fonction alcool rend la sérine faiblement **hydrophile**, mais surtout permet des estérifications avec l'acide phosphorique, importantes dans la régulation de l'activité des protéines.
- La sérine représente environ 4 % des acides aminés des protéines de notre organisme.
- Certains aliments sont riches en sérine : oeufs, lait, riz ; d'autres en sont pauvres : pommes de terre.



Glycine (Gly) G

- Le glycofolle (**glycine** en anglais) est un acide aminé neutre.
- Le radical de la **glycine** se réduit à un atome d'hydrogène. La **glycine** est le seul acide aminé dont la structure soit symétrique.
- Bien qu'il soit le moins polaire de tous les acides aminés, le **glycofolle** confère peu de propriétés à la protéine.
- La **glycine** représente environ 5 % des acides aminés des protéines de notre organisme.
- Certains aliments sont riches en glycofolle : orge, riz, gélatine ; d'autres en sont pauvres : lait, pommes de terres...

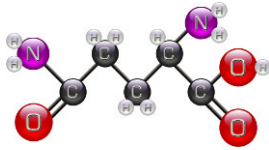


Glutamine

- La **glutamine** est un acide aminé amidé.
- Le radical de la glutamine est constitué d'une chaîne de 3 carbones qui se termine par une fonction acide carboxylique, amidifiée par une molécule d'ammoniaque. Cette amidification cache les propriétés de la fonction acide.
- A cause des liaisons hydrogène autour de la liaison amide, la glutamine est un radical faiblement polaire, et chimiquement neutre.
- La glutamine représente environ 9 % des acides aminés des protéines de notre organisme.
- La **glutamine** est aussi le **plus abondant des acides aminés** libres en circulation dans le sang.

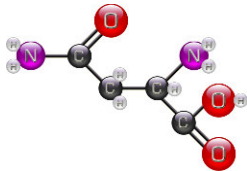
En plus :

- La glutamine est réputée pour ses divers effets sur l'accélération de la guérison après une opération chirurgicale, à priori sans effets secondaires. Les temps de convalescence après une opération de chirurgie abdominale sont réduits si l'on nourrit le patient par intraveineuse avec des mélanges contenant de la glutamine.



Asparagine (Asn) N

- L'**asparagine** est un **acide aminé amidé**.
- Le radical de l'**asparagine** est constitué d'une chaîne de 2 carbones qui se termine par une fonction acide carboxylique, amidifiée par une molécule d'ammoniaque. Cette amidification cache les propriétés de la fonction acide.
- A cause des liaisons hydrogène autour de la liaison amide, l'**asparagine** est un **radical faiblement polaire**, mais chimiquement neutre.
- L'asparagine représente environ 3 % des acides aminés des protéines de notre organisme.



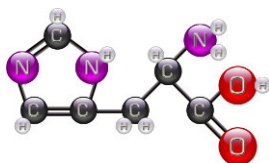
Histidine (His) H

- L'**histidine** est un **acide aminé basique**.
- Le radical de l'histidine comprend un carbone et un **noyau imidazole** formé de trois carbones et de deux azotes. Ce noyau est ionisable et le pK est de 6,0, ce qui est très voisin des pH habituels des compartiments cellulaires. Le noyau imidazole est polaire mais peu hydrophile.
- Les échanges d'hydrogène avec le noyau imidazole se faisant facilement au pH physiologique, l'**histidine est un radical fréquent dans les sites catalytiques des enzymes**.
- L'histidine représente environ 3 % des acides aminés des protéines de notre organisme.
- Certains aliments sont riches en histidine : viande, abats ; d'autres en sont pauvres : chou-fleur.

En plus :

L'**histidine** est un acide aminé qui remplit des fonctions importante dans la structure et la fonction des protéines. Son **noyau imidazole** dispose d'un atome d'**azote pouvant capter un proton**, avec un pKa proche de la neutralité (pKa~6.8) et donc des conditions physiologiques.

- Elle permet à certains résidus d'histidine présents dans les sites actifs d'enzymes d'intervenir dans des réactions de **transfert de proton**, dans les conditions physiologiques du cytoplasme (pH~7).
- Dans l'**hémoglobine**, les histidines présentes dans la protéine participent au maintien du pH sanguin, en agissant comme molécule tampon



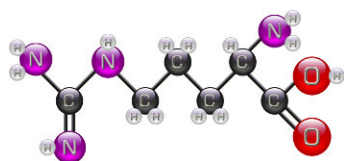
Arginine (Arg) R

- L'**arginine** est un **acide aminé basique** : c'est le **plus basique** des 20 acides aminés.

- Le radical comporte une chaîne de 3 carbones suivie d'un noyau guanidinium : un atome de carbone entouré de trois fonctions amine. Un électron ionisé crée une charge positive dans le **noyau guanidinium**, délocalisée dans les orbitales des trois liaisons C-N.
- Le **noyau guanidinium** est très basique ($pK = 12,5$) ce qui confère une charge positive immuable à ce radical. De ce fait, le radical de l'arginine est le plus polaire et le plus hydrophile des tous les radicaux d'acides aminés des protéines. Cette charge positive crée des liaisons électrovalentes avec des charges électriques négatives d'autres acides aminés (Asp, Glu,...), contribuant à la structure tertiaire et quaternaire de la protéine. L'arginine entre aussi dans la structure de nombreux sites de liaison où elle contribue à fixer le ligand par des liaisons électrovalentes.
- L'arginine représente environ 7 % des acides aminés des protéines de notre organisme.
- Certains aliments sont riches en arginine : noix, noisettes, riz ; d'autres en sont pauvres : betteraves, carottes, pain.

En plus :

- L'**arginine** est un acide aminé "semi-essentiel" synthétisé normalement par l'organisme en fonction de ses besoins, à partir duquel le corps fabrique de l'**oxyde nitrique** (substance qui favorise la dilatation des vaisseaux sanguins) et de la **créatine** (nutriment non essentiel associé au développement et au fonctionnement des muscles).

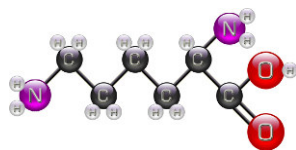


Lysine (Lys) K

- La **lysine** est un **acide- α -aminé basique** et **essentiel**
- C'est l'**un des plus courant** des 20 acides aminés
- Le radical comporte une chaîne de **4 carbones** suivie d'une fonction amine, dont un électron ionisé crée une **charge positive**.
- Le radical de la lysine est très basique ($pK = 10,8$) ce qui lui confère une charge positive stable. De ce fait, le radical de la lysine est **très polaire et très hydrophile**. Cette charge positive crée des liaisons électrovalentes avec des charges électriques négatives d'autres acides aminés (Asp, Glu,...), contribuant à la structure tertiaire et quaternaire de la protéine. L'arginine entre aussi dans la structure de nombreux sites de liaison où elle contribue à fixer le ligand par des liaisons électrovalentes.
- La lysine représente environ 8 % des acides aminés des protéines de notre organisme.
- Certains aliments sont riches en lysine : viande, abats ; d'autres en sont pauvres : pain, oléagineux

Aussi :

- L'allysine, un dérivé de la lysine, est utilisé dans la production de l'**élastine** et de **collagène**



2 Production de protéines recombinantes

2.1 Cartographie des plasmides

2.1.1 pet 24a

pET-24a-d(+) Vectors

TB070 12/98

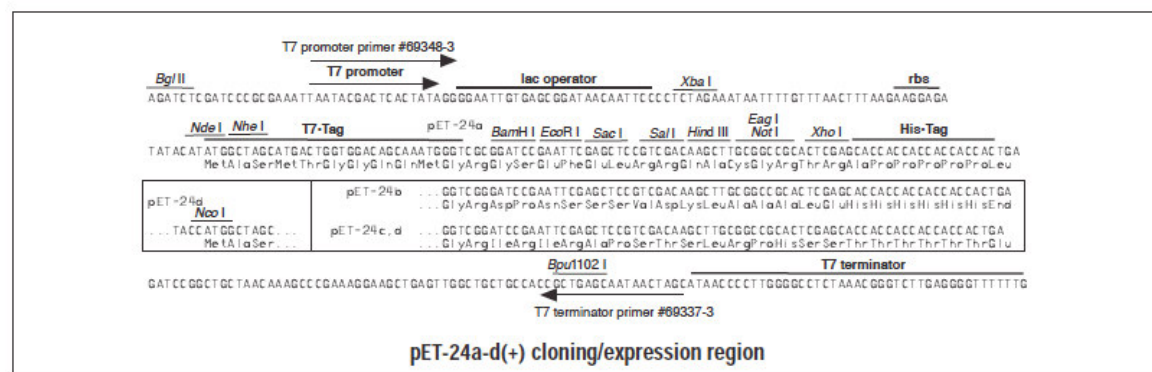
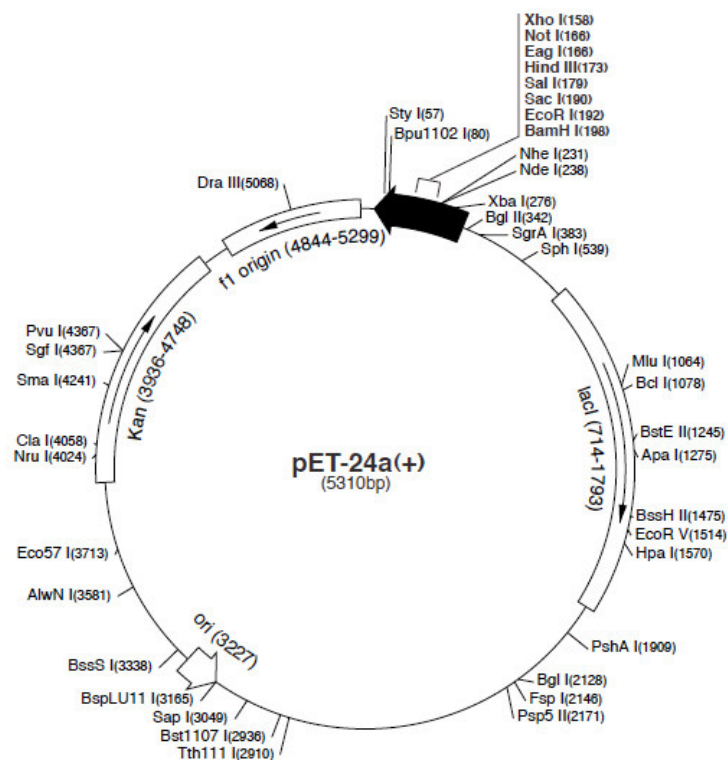
	Cat. No.
pET-24a DNA	69749-3
pET-24b DNA	69750-3
pET-24c DNA	69751-3
pET-24d DNA	69752-3

The pET-24a-d(+) vectors carry an N-terminal T7•Tag[®] sequence plus an optional C-terminal His•Tag[®] sequence. These vectors differ from pET-21a-d(+) only by their selectable marker (kanamycin vs. ampicillin resistance). Unique sites are shown on the circle map. Note that the sequence is numbered by the pBR322 convention, so the T7 expression region is reversed on the circular map. The cloning/expression region of the coding strand transcribed by T7 RNA polymerase is shown below. The f1 origin is oriented so that infection with helper phage will produce virions containing single-stranded DNA that corresponds to the coding strand. Therefore, single-stranded sequencing should be performed using the T7 terminator primer (Cat. No. 69337-3).

pET-24a(+) sequence landmarks

T7 promoter	311-327
T7 transcription start	310
T7•Tag coding sequence	207-239
Multiple cloning sites (<i>Bam</i> H I - <i>Xho</i> I)	158-203
His•Tag coding sequence	140-157
T7 terminator	26-72
<i>lacI</i> coding sequence	714-1793
pBR322 origin	3227
Kan coding sequence	3936-4748
f1 origin	4844-5299

The maps for pET-24b(+), pET-24c(+) and pET-24d(+) are the same as pET-24a(+) (shown) with the following exceptions: pET-24b(+) is a 5309bp plasmid; subtract 1bp from each site beyond *Bam*H I at 198. pET-24c(+) is a 5308bp plasmid; subtract 2bp from each site beyond *Bam*H I at 198. pET-24d(+) is a 5307bp plasmid; the *Bam*H I site is in the same reading frame as in pET-24c(+). An *Nco* I site is substituted for the *Nde* I site with a net 1bp deletion at position 238 of pET-24c(+). As a result, *Nco* I cuts pET24d(+) at 234, and *Nhe* I cuts at 229. For the rest of the sites, subtract 3bp from each site beyond position 239 in pET-24a(+). *Nde* I does not cut pET-24d(+). Note also that *Sty* I is not unique in pET-24d(+).



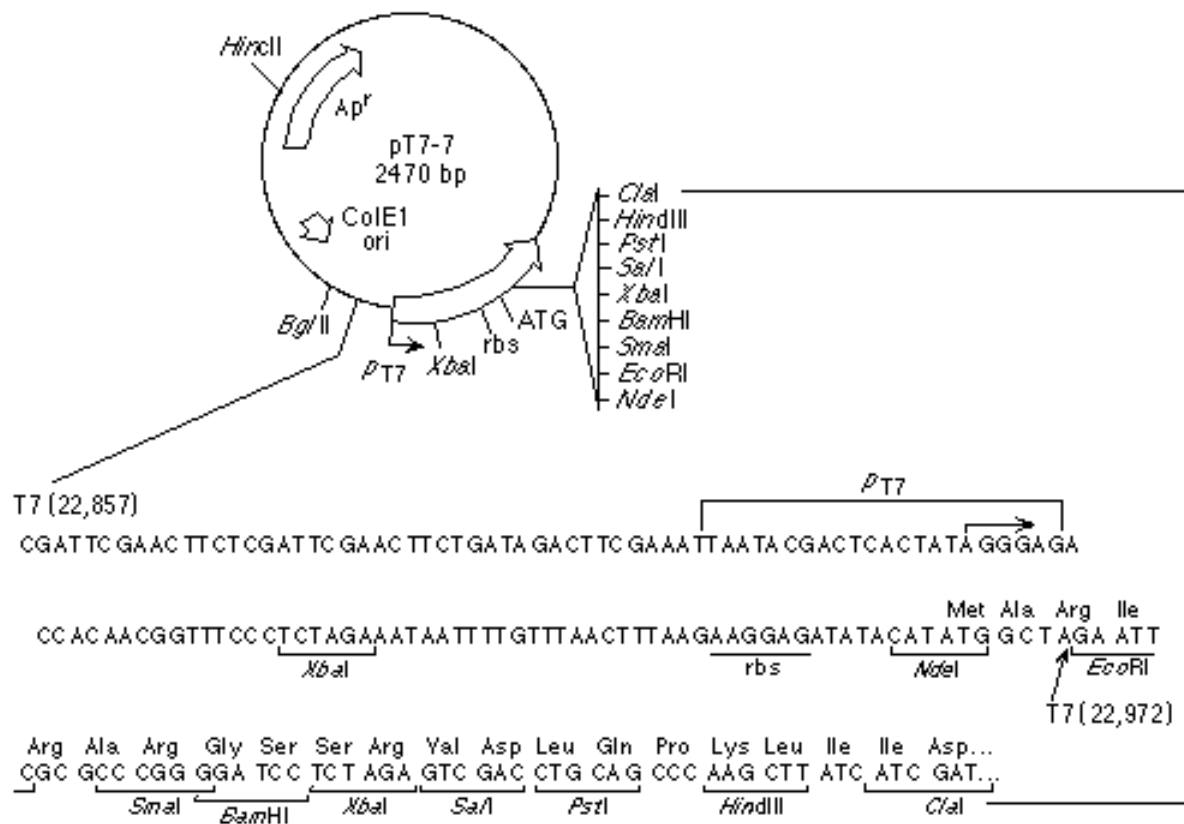
pET-24a(+) Restriction Sites

Enzyme	# Sites	Locations					
AccI	2	180	2935				
AccII	7	831	1559	1890	2674	2815	
		3117	4908				
Acil	74						
AflIII	2	1064	3165				
AluI	22						
AlwI	13						
Alw21I	7	159	190	564	1048	2159	
		2983	3483				
Alw44I	3	1044	2979	3479			
AlwNI	1	3581					
ApaI	1	1275					
ApaBI	1	748					
ApoI	6	192	1339	3980	4164	4870	
		4881					
AvaI	2	158	4239				
Avall	5	1616	1992	2080	2171	2450	
BamHI	1	198					
BanI	8	386	407	521	984	1703	
		1833	1959	5105			
BanII	6	190	448	462	1275	4022	
		5143					
BbsI	4	1210	1549	1923	2283		
BbvI	23						
BccI	13						
Bce83I	6	21	1878	2048	3256	3554	
		3795					
BceII	6	583	924	1551	3667	4686	
		5094					
BcgI	9	160	194	228	1356	1390	
		1890	1924	2742	2776		
BclI	1	1078					
BfaI	7	70	232	277	2179	3660	
		3967	5219				
BglI	1	2128					
BglII	1	342					
BmgI	1	1273					
BpmI	4	902	1391	2025	2692		
Bpu10I	2	2271	4384				
Bpu1102I	1	80					
BsaAI	2	2917	5068				
BsaBI	3	341	347	2362			
BsaBI	5	387	408	522	1021	1704	
BsaJI	9	57	501	507	1699	2137	
		3325	4238	4239	4640		
BsaWI	7	2	1383	1886	2354	3371	
		3518	4502				
BsaXI	2	1723	5016				
Bsbl	2	2881	4975				
BscGI	11						
BsgI	3	915	1115	2325			
Bsil	1	3338					
BsiEI	5	169	1849	3081	3505	4367	
BsII	23						
BsmI	2	4251	4328				
BsmAI	6	761	1166	1292	1679	2806	
		4383					
BsmBI	3	1679	2806	4383			
BsmFI	4	525	2066	2436	5283		
BsoFI	41						
Bsp24I	12						
Bsp1286I	12						
BspEI	2	2	2354				
BspGI	1	2691					
BspLU11I	1	3165					
BsrI	22						
BsrBI	4	297	3098	4766	5212		
BsrDI	2	1111	1477				
BsrFI	7	374	383	750	1962	2122	
		4321	5169				
BssHII	1	1475					
Bst1107I	1	2936					
Enzyme	# Sites	Locations					
BstEII	1	1245					
BstXI	3	866	995	1118			
BstYI	9	132	198	342	628	1840	
		2357	3806	3817	4616		
CacBI	40						
CjeI	26						
CjePI	20						
Clal	1	4058					
CviJI	83						
CviRI	22						
DdeI	11						
DpnI	21						
DraIII	1	5068					
DrdI	3	2858	3273	5023			
DrdII	2	787	5073				
Dsal	2	501	2137				
EaeI	4	166	372	504	1738		
EagI	1	166					
EaeI	3	682	3049	4180			
Ecil	3	841	3239	3385			
Eco47III	3	469	1970	2419			
Eco57I	1	3713	3713				
EcoNI	2	599	4279				
EcoO109I	3	53	497	2171			
EcoRI	1	192					
EcoRII	9	787	1102	1642	1699	3191	
		3312	3325	4255	4612		
EcoRV	1	1514					
FauI	17						
FokI	9	1110	1119	2384	2446	2524	
		2710	2851	4005	4611		
FspI	1	2146					
GdiI	4	166	372	504	1738		
HaeI	6	792	2113	3180	3191	3643	
		4454					
HaeII	14						
HaeIII	23						
HgaI	11						
HgiEII	2	662	3751				
HhaI	46						
Hin4I	3	963	4053	4595			
HincII	2	181	1570				
HindIII	1	173					
HinfI	18						
HpaI	1	1570					
HphI	16						
MaeII	14						
MaeIII	16						
MbolI	12						
MluI	1	1064					
MmeI	7	3380	3564	4009	4203	4565	
		4574	5045				
MnlI	25						
MseI	25						
MslI	6	1116	1404	1434	2152	2347	
		2738					
MspI	29						
MspAII	8	84	1094	1664	1757	2756	
		2875	3507	3752			
MwoI	39						
NarI	4	387	408	522	1704		
NciI	12						
NdeI	1	238					
NgoAIV	4	374	1962	2122	5169		
NheI	1	231					
NlaIII	25						
NlaIV	21						
NotI	1	166					
NruI	1	4024					
NsiI	2	4217	4483				
NspI	4	539	2510	2802	3169		
Pft1108I	1	1951					
Enzyme	# Sites	Locations					
PfIMI	2	646	4630				
PleI	9	325	613	700	1496	3059	
		3544	4599	5003	5011		
PshAI	1	1909					
Psp5II	1	2171					
Psp1406I	4	726	2094	2490	4853		
PvuI	1	4367					
PvuII	3	1664	1757	2756			
RcaI	3	462	3885	4760			
RsaI	3	1211	2971	4202			
SacI	1	190					
Sall	1	179					
SapI	1	3049					
Sau96I	14						
Sau3AI	21						
ScrFI	21						
SfaNI	23						
SfiI	4	310	3430	3621	5287		
SgfI	1	4367					
SgrAI	1	383					
SmaI	1	4241					
SphI	1	539					
SspI	2	4292	4860				
StyI	1	57					
TaqI	15						
TaqII	6	972	1190	1863	3067	4621	
		4972					
TfiI	9	1743	2045	2215	2719	3140	
		4278	4334	4506	4597		
ThaI	36						
TseI	23						
Tsp45I	7	1245	2073	2604	2817	2912	
		4514	5241				
Tsp509I	20						
Tth111I	1	2910					
Tth1111I	8	903	1596	2626	3755	3762	
		3794	4203	4330			
UbaII	18						
VspI	5	325	1749	1808	4566	4755	
XbaI	1	276					
XcmI	3	920	1436	1454			
XhoI	1	158					
XmnI	2	2723	4756				

Enzymes that do not cut pET-24a(+):

AatII
BaeI
Bsu36I
MscI
PmeI
SacII
SpeI
SwaIAflII
BsaI
DraI
MunI
PmlI
ScaI
SrfIAgeI
BseRI
Eam1105I
NcoI
PstI
SexAI
Sse8387IAscI
BspMI
FseI
NspV
RleAI
SfiI
StuIAvrII
BsrGI
KpnI
PacI
RsrII
SnaBI
SnaI

2.1.2 pt7-7



2.2 Protocole pour transformer des bactéries

- ajouter 1 à 100 μ g de plasmide dans un tube de bactéries compétentes
- incubé 45' dans la glace à 4 °C
- choc thermique 1'30'' à 42 °C
- incubé 15' dans la glace à 4 °C
- ajouter 1 ml de milieu LB
- incubé 1 h à 37 °C sous agitation
- centrifuger 2' à 10000 g
- retirer 1 ml de milieu
- étaler sur boîte LB agar + antibiotique(s)

L'antibiotique à ajouter est celui correspondant au gène de résistance du plasmide incorporé. Il s'agit de la kanamycine dans le cas du pet24a et de l'ampicilline pour le pt7-7. Lorsque des bactéries PlysS sont utilisées, il faut rajouter l'antibiotique chloramphénicol afin de conserver le plasmide propre au PlysS.

2.3 Protocoles de purification

2.3.1 Het-s 218-289 :

- Reprendre les bactéries dans un tampon 100 mM Tris HCl pH 8, 150 mM NaCl (noté TpA)
- Lyser par bain ultrasons
- Centrifuger le lysat 45 min à 30000 g
- Reprendre le culot contenant les corps d'inclusion dans un TpA + 6 M Guanidine
- Centrifuger 45 min à 30000 g
- Filtrer le surnageant à 0,22 μ
- Charger sur colonne his trap équilibrée avec TpA + urée 8 M
- Laver avec TpA + urée 8 M
- Laver avec TpA + urée 8 M + IMDZ 10 mM
- Eluer avec TpA + urée 8 M + IMDZ 300 mM
- Récupérer les fractions intéressantes
- Dialyser contre acide acétique 1%

2.3.2 Rubrédoxine de methanococcus voltae

- Reprendre les bactéries en acide acétique 1% (v/v) : 50 ml par gramme de culot
- Lyser par bain ultrasons
- Centrifuger le lysat 10' à 9000 g
- Filtrer le surnageant à 0,22 μ
- Charger sur colonne his trap équilibrée avec de l'acide acétique
- Laver avec de l'acide acétique
- Eluer avec de l'acide acétique + imidazole 300 mM

- Récupérer les fractions intéressantes
- Dialyser contre tampon adapté

2.3.3 Rd-het : lyse en acide acétique

- Reprendre les bactéries en acide acétique 1% (v/v) : 50 ml par gramme de culot
- Lyser par bain ultrasons
- Centrifuger le lysat 10' à 9000 g
- Filtrer le surnageant à 0,22 μ
- Charger sur colonne his trap équilibrée avec de l'acide acétique
- Laver avec de l'acide acétique
- Eluer avec de l'acide acétique + NaCl 100 mM
- Récupérer les fractions intéressantes
- Stocker à 4 °C

2.3.4 Rd-het : lyse en urée 8 M

- Reprendre les bactéries dans 200 mL Tp tris 10mM pH8, urée 8 M
- Lyser par bain ultrasons
- Centrifuger le lysat 30' à 40000 g
- Filtrer le surnageant sur 0,45 μ m
- Charger sur colone Nickel préalablement équilibrée avec Tp tris 10 mM pH8, urée 8 M
- Rincer avec Tp tris 10 mM pH8, urée 8 M
- Rincer avec Tp tris 10 mM pH8, urée 8 M, IMDZ 15 mM
- Eluer avec Tp tris 10 mM pH8, urée 8 M, IMDZ 300 mM
- Récupérer les fractions intéressantes
- Dialyser contre de l'acide acétique 1%